

# **“Beta-lactamasas en Enterobacteriaceae: Aspectos genéticos, epidemiológicos, clínicos y biológicos”**

**Tesis doctoral**

**Ana Fernández González**

**Octubre 2012**

**Tesis Doctoral dirigida por el Dr. Germán Bou Arévalo.**

**Servicio de Microbiología-Instituto de Investigación Biomédica A Coruña**



El director de la tesis doctoral, D. Germán Bou Arévalo, Doctor en Ciencias Biológicas por la Universidad Autónoma de Madrid, Jefe del Servicio de Microbiología y Parasitología del Complejo Hospitalario Universitario A Coruña y Profesor Asociado de la Universidad de Santiago de Compostela, y la tutora, Dña. Ángeles Cid Blanco, Doctora en Ciencias Biológicas y Profesora Titular de la Universidad de A Coruña.

**CERTIFICAN:**

Que Dña. Ana Fernández González, Licenciada en Farmacia por la Universidad de Santiago de Compostela y Especialista en Microbiología y Parasitología, ha realizado en el Servicio de Microbiología y en la Unidad de Investigación del Complejo Hospitalario Universitario A Coruña, y bajo su dirección y tutela, respectivamente, el trabajo **“Beta-lactamasas en Enterobacteriaceae: Aspectos genéticos, epidemiológicos, clínicos y biológicos”**, el cuál, reúne todas las condiciones para ser presentado como Tesis Doctoral.

Y para que así conste, y surta los efectos oportunos, firmamos el presente certificado en A Coruña, Octubre de 2012.

Dr. Germán Bou Arévalo

Director

Dra. Ángeles Cid Blanco

Tutora





## **AGRADECIMIENTOS**

Son muchas las personas que a lo largo de estos años han compartido conmigo sus conocimientos, su amistad, su tiempo, sus penas y alegrías, sus hallazgos y sus desengaños, a todos ellos millones de gracias, en mi corazón están, aunque sea imposible nombrarlos a todos.

En primer lugar quiero agradecer a mi director de tesis el Dr Germán Bou, sin el cual este trabajo no habría sido posible, gracias por haber confiado en mí y darme las oportunidades necesarias para realizarlo.

Gracias a tod@s las chic@s que forman o han formado parte del Servicio de Microbiología, por su ayuda y su apoyo, por enseñarme tantas cosas y haber compartido tantos momentos.

Gracias a mis compis de investigación y sobre todo amigos que me acompañan o acompañaron en el laboratorio, mentes brillantes cargadas de simpatía que día a día le ponen una sonrisa a la vida y hacen más llevadero el, a veces complicado, trabajo científico. A Susi, Meri, Sori, Clara, Zé, Patri, Carlos, Laura, la Gato, María L, Álex, Jose, Carmen, Jose A, María, MJ, Mónica, Delia etc...

Especialmente le agradezco a Astrid con la que comencé casi a la par esta aventura, por su generosidad y su paciencia infinitas, por ayudarme siempre y estar ahí en las buenas y en las malas.

A Mariqui por enseñarme a perseguir los sueños y luchar por ellos, por tanto esfuerzo y dedicación, a Marga por estar siempre dispuesta a ayudar con marrones varios y a Jesús porque realmente es la perla.

Y por último a mi familia. A mis padres, porque me siento muy orgullosa de tenerlos, por su fortaleza y capacidad de seguir adelante. A mi madre, luchadora incansable de la que he aprendido muchas cosas buenas y otras más peculiares que me hacen ser lo que soy. A mi tía Tensi por haber creído siempre en mí, por su vitalidad infinita, por su risa contagiosa, y su visión siempre optimista de la vida que echo tanto de menos. Y a mi amor, Marcos, por su cariño infinito, su apoyo incondicional, su paciencia y sus desvelos, por su comprensión y por hacerme sentir siempre tan afortunada.



## ÍNDICE

ABREVIATURAS .....	11
RESUMEN .....	13
1. INTRODUCCIÓN .....	17
1.1. El problema de la resistencia a los antibióticos .....	17
1.2. Familia Enterobacteriaceae .....	17
1.2.1. Estructura de la pared celular en bacterias Gram-negativas .....	18
1.3. Propagación de la resistencia .....	21
1.3.1. Mecanismos de intercambio genético: .....	21
1.3.1.1. Transformación .....	21
1.3.1.2. Transducción .....	22
1.3.1.3. Conjugación .....	22
1.3.1.4. Transmisión a través de vesículas de membrana externa .....	22
1.3.2. Elementos de transferencia horizontal en enterobacterias .....	23
1.3.2.1. Plásmidos .....	23
1.3.2.2. Secuencias de inserción .....	24
1.3.2.3. Transposones .....	24
1.3.2.4. Integrones .....	26
1.4. Antibióticos $\beta$ -lactámicos .....	26
1.4.1. Aspectos generales y mecanismo de acción .....	26
1.5. Mecanismos de resistencia a los antibióticos $\beta$ -lactámicos .....	27
1.5.1. Modificación de las dianas .....	27
1.5.2. Alteraciones de la permeabilidad .....	28
1.5.3. Sistemas de expulsión .....	29

1.5.4. Producción de enzimas $\beta$ -lactamasas.....	29
1.6. $\beta$ -lactamasas.....	29
1.6.1. Clasificación general .....	30
1.6.2. Origen de las $\beta$ -lactamasas .....	32
1.6.3. $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE) .....	33
1.6.4. Dispersión de BLEE .....	35
1.6.4.1. Diseminación clonal .....	35
1.6.4.2. Diseminación a través de elementos móviles, (plásmidos, transposones, integrones) .....	36
1.6.4.2.1. Diseminación plasmídica.....	37
1.6.4.2.2. Secuencias de inserción, transposones e integrones .....	38
1.6.5. Epidemiología de enterobacterias productoras de BLEE .....	39
2. OBJETIVOS .....	43
3. CAPÍTULOS: .....	47
3.1. Capítulo I: Diseminación interespecie de la BLEE CTX-M-32 y el papel de la secuencia de inserción <i>IS1</i> en la reducción de la expresión del gen <i>bla</i> <sub>CTX-M-32</sub> .....	47
3.2. Capítulo II: Aparición en España de un aislamiento clínico de <i>Enterobacter cloacae</i> multirresistente productor de la BLEE SFO-1 .....	50
3.3. Capítulo III: La expresión de las $\beta$ -lactamasas de tipo OXA y la SFO-1 provoca cambios en la composición del peptidoglicano y afecta a la <i>fitness</i> bacteriana.....	53
4. DISCUSIÓN .....	61
5. CONCLUSIONES .....	73
6. REFERENCIAS .....	77

---

7. ANEXOS .....	93
7.1. Anexo I.....	95
7.2. Anexo II .....	105
7.3. Anexo III.....	115
7.4. CURRICULUM VITAE.....	127



**ABREVIATURAS**

**ADN:** Ácido desoxirribonucleico

**AMC:** Amoxicilina-clavulánico

**BLEE:**  $\beta$ -lactamasa de espectro extendido

**CI:** Índice de competición

**CLAV:** Ácido clavulánico

**CLSI:** Clinical and Laboratory Standards Institute

**CMI:** Concentración mínima inhibitoria

**CTn:** Transposones conjugativos

**Da:** Daltons

**EDTA:** Ácido etileno-diamino-tetra-acético

**EUCAST:** European Committee on Antimicrobial susceptibility testing

**G:** N-Acetilglucosamina

**IC:** Intervalo de confianza

**IR:** Secuencias repetidas e inversas

**IRR:** Secuencia repetida e inversa derecha

**IRL:** Secuencia repetida e inversa izquierda

**IS:** Secuencias de inserción

**ITU:** Infección del tracto urinario

**Kb:** kilobases

**LPS:** Lipopolisacárido

**M:** N-Acetilmurámico

**MBLs:** Metallo- $\beta$ -lactamasas

**mg:** Miligramo

**OR:** Odds ratio

**OMV:** Vesículas de membrana externa

**pb:** Pares de bases

**PBP:** Proteína fijadora de penicilina

**PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa

**RFLP:** análisis del polimorfismo de los fragmentos de restricción

**PG:** Peptidoglicano

**PFGE:** Electroforesis en campo pulsado

**pI:** Punto isoelectrico

**Pm:** Peso molecular

**Rep-PCR:** PCR de secuencias palindrómicas repetidas extragénicas

**UCI:** Unidad de cuidados intensivos

**UDP-M:** Uridina difosfato-N-acetilmurámico

**UDP-G:** Uridina difosfato-N-acetilglucosamina



## RESUMEN

Esta tesis versa sobre el estudio de las enzimas  $\beta$ -lactamasas como mecanismo de resistencia a los antibióticos teniendo como objetivos investigar los factores que influyen en su expresión, en su diseminación, y en la epidemiología de las mismas a través del estudio de funciones fisiológicas más allá de su papel actual conocido.

La tesis se divide en tres capítulos:

En el primero se estudió la transmisión *in vivo*, del gen de una  $\beta$ -lactamasa de espectro extendido (BLEE), *bla*<sub>CTX-M-32</sub>, entre diferentes especies de enterobacterias (dos *Escherichia coli* y un *Proteus mirabilis*). Además se demostró que una secuencia de inserción, la *ISI*, localizada en el promotor de la misma, podía actuar como regulador negativo de la expresión de la  $\beta$ -lactamasa.

En el segundo capítulo se estudió la epidemiología clínica y molecular de un brote hospitalario causado por una cepa epidémica de *Enterobacter cloacae* multirresistente que producía la BLEE SFO-1.

Finalmente, en el tercer capítulo se analizó el papel de las  $\beta$ -lactamasas en el metabolismo del peptidoglicano bacteriano, lo que podría revelar una función fisiológica ancestral más allá de la resistencia a los  $\beta$ -lactámicos, y a su vez aportar datos acerca de la epidemiología actual de las mismas.

## RESUMO:

Esta tese trata sobre o estudo das enzimas  $\beta$ -lactamasas como mecanismo de resistencia ós antibióticos, tendo como obxectivos investigar os factores que inflúen na súa expresión, na súa diseminación e na epidemioloxía das mesmas a través do estudo das funcións fisiolóxicas máis alá do seu papel actual coñecido.

A tese divídese en tres capítulos.

No primeiro estudouse a transmisión *in vivo* do xen dunha  $\beta$ -lactamasa de espectro extendido, *bla*<sub>CTX-M-32</sub>, entre diferentes especies de enterobacterias (dúas *Escherichia coli* e un *Proteus mirabilis*). Tamén se demostrou que unha secuencia de inserción, a *ISI*, localizada no promotor da mesma, podía actuar como regulador negativo da expresión da  $\beta$ -lactamasa.

No segundo capítulo estudouse a epidemioloxía clínica e molecular dun brote hospitalario causado por unha cepa epidémica de *Enterobacter cloacae* multirresistente que producía a BLEE SFO-1.

Finalmente, no terceiro capítulo, analizouse o papel das  $\beta$ -lactamasas no metabolismo do peptidoglicano bacteriano, o que podería revelar unha función fisiolóxica ancestral, máis alá da resistencia ós  $\beta$ -lactámicos, e o mesmo tempo aportar datos acerca da epidemioloxía actual das mesmas.

### ABSTRACT

This thesis is about the study of  $\beta$ -lactamases enzymes as a mechanism of resistance to antibiotics and the objectives were to investigate the factors that influence in its expression, in its spread and epidemiology.

The thesis is divided in three chapters:

In the first one it was studied the *in vivo* transmission of an extended spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL), *bla*<sub>CTX-M-32</sub>, among different species of Enterobacteriaceae (two *Escherichia coli* and one *Proteus mirabilis*). Also it was described the role of insertion sequence *IS1*, located in the promotor of the ESBL, as a negative regulator of the expression of this ESBL.

In the second chapter it was studied the clinical and molecular epidemiology of a hospital outbreak caused by an epidemic strain of *Enterobacter cloacae* multidrug-resistant that produced the SFO-1 ESBL.

Finally, in the third chapter it was analyzed the role of  $\beta$ -lactamases in the peptidoglycan metabolism, that could reveal a physiological function more than the resistance to  $\beta$ -lactams, and give us data about their present epidemiology.

## **1. INTRODUCCIÓN**



## **1. INTRODUCCIÓN**

### **1.1. El problema de la resistencia a los antibióticos**

La situación de resistencia a los antimicrobianos está empeorando cada vez más y constituye un grave problema de salud a nivel mundial. En los hospitales ya existen infecciones causadas por microorganismos multirresistentes para los que no se dispone de un tratamiento adecuado, lo que prolonga el proceso infeccioso y aumenta el riesgo de complicaciones y la mortalidad (1). Este hecho es debido a la amplia diversidad de mecanismos de resistencia a los antimicrobianos y también al escaso desarrollo de nuevos antimicrobianos que sean capaces de combatir estos microorganismos (2, 3). Este panorama tan desolador se presenta mayoritariamente en los bacilos Gram-negativos (3) y, dentro de éstos, en la familia Enterobacteriaceae. Aunque cabe destacar que también existen investigaciones prometedoras en curso, como por ejemplo sobre nuevos péptidos antimicrobianos (4).

Para intentar ganar esta batalla hay que actuar en diferentes frentes. Uno de ellos consiste en concienciar a todos los sectores que manejan los antibióticos (médicos, farmacéuticos, veterinarios, etc) de la importancia de un uso responsable. Además, habría que incrementar la investigación tanto de nuevos antimicrobianos y de inhibidores eficaces contra determinados mecanismos de resistencia (5), como de técnicas de diagnóstico mejoradas. Por otra parte, es fundamental potenciar la investigación que nos proporcione el conocimiento necesario para conseguir una mejor comprensión de los mecanismos de resistencia, sus consecuencias y los motivos de su expansión (6), temas sobre los cuales versa el presente trabajo.

### **1.2. Familia Enterobacteriaceae**

Las enterobacterias pertenecen a una familia heterogénea y amplia de bacilos Gram-negativos que constituyen el componente principal de la flora intestinal humana. En esta familia se incluyen tanto microorganismos patógenos como otros que sólo producen infecciones de forma ocasional. Algunas especies de esta familia causan enfermedades en humanos como neumonía, meningitis, sepsis, infecciones de heridas, infecciones del tracto urinario (ITU) e infecciones en el intestino. En el paciente hospitalizado las enterobacterias

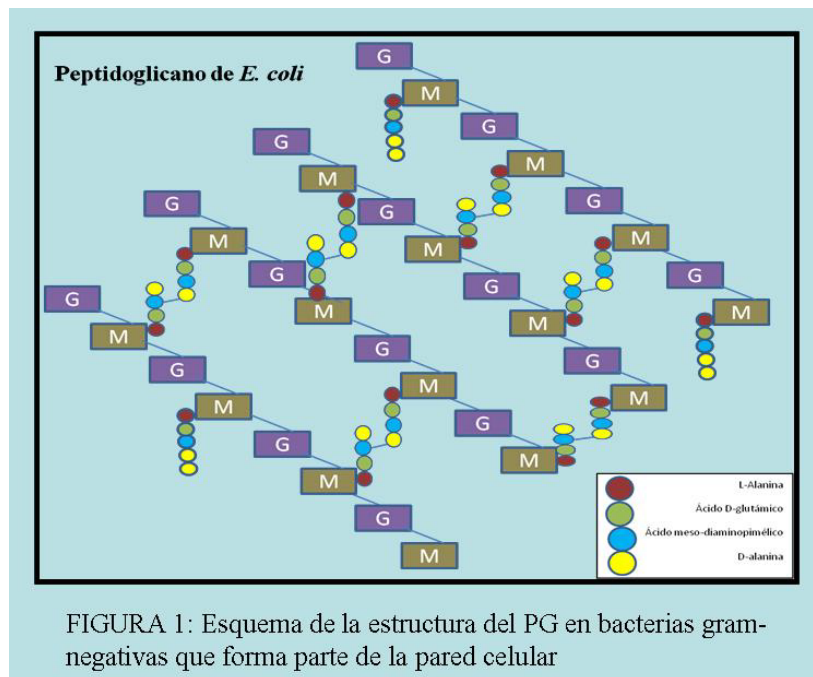
colonizan el tubo digestivo, la orofaringe, el aparato genitourinario y la piel mientras que en el ambiente hospitalario pueden aislarse a partir del agua, catéteres, sondas, sueros, antisépticos, equipos de respiración mecánica, etc. Los microorganismos que viven en estos nichos hospitalarios pueden interaccionar con los pacientes hospitalizados, causando infecciones nosocomiales (7).

Las enterobacterias constituyen el 50% de las bacterias con importancia clínica aisladas en los laboratorios de microbiología clínica. Son responsables del 50% de los casos de sepsis, de más del 70% de las infecciones del tracto urinario y de un significativo porcentaje de infecciones del tracto digestivo (7).

Los géneros de enterobacterias que se aíslan con más frecuencia en un laboratorio de microbiología clínica son *Escherichia* y *Klebsiella* seguidas de *Enterobacter*, *Citrobacter* y las diferentes especies del grupo *Proteus-Morganella-Providencia* (7).

### **1.2.1. Estructura de la pared celular en bacterias Gram-negativas**

La pared celular de las enterobacterias está formada por una bicapa lipídica conocida como membrana externa, que contiene proteínas tales como las porinas, formadoras de canales que permiten el paso de moléculas hidrofílicas no mayores de 1000 daltons (Da). Se localizan también en esta membrana externa los fosfolípidos y el lipopolisacárido (LPS), cuya región más interna, conocida como lípido A, es una endotoxina formada por ácidos grasos insaturados. Dicha región es la principal responsable de la menor fluidez de la membrana externa y de la poca permeabilidad a muchas moléculas hidrofílicas, incluyendo muchos antibióticos. La región de polisacáridos del LPS la forman el núcleo, también conocido como *core* al cual se ancla en la región más distal, denominada polisacárido específico O, cuya especificidad viene determinada por una secuencia repetitiva de azúcares, a menudo ramificados. Las variaciones en las ramificaciones constituyen el antígeno somático O. Esta porción condiciona la virulencia de las bacterias Gram-negativas patógenas, por lo que debe ser esencial en la interacción hospedador-huésped. Además, en la parte interna de la membrana externa se localiza un complejo denominado lipoproteína con funciones de anclaje entre la membrana externa y el peptidoglicano (PG).



El PG es otro componente importante de la pared celular (Figura 1) y se encuentra inmerso en el espacio periplásmico, compartimento localizado entre la membrana citoplasmática y la membrana externa. El PG determina la forma celular de la bacteria y sirve de sitio de anclaje para factores de virulencia y adhesinas. Además, ayuda a la bacteria a llevar a cabo transformaciones morfológicas en respuesta a distintos factores y su fragilidad ó inestabilidad podría conducir a la lisis celular y, por lo tanto, a la muerte. Está constituido por una o varias monocapas formadas por repeticiones de una unidad disacárida, N-acetilglucosamina (G), unida mediante un enlace  $\beta$ -1,4 al ácido N-acetilmurámico (M), formando cadenas de polisacáridos. Las uniones cruzadas entre las monocapas refuerzan la estructura, dotándola de una estabilidad química y una resistencia mecánica que, junto con la membrana externa, impide la lisis en medios especialmente hipotónicos y contribuye a mantener la forma celular (8).

La síntesis del PG se inicia en el citoplasma bacteriano por seis enzimas Mur (nombradas MurA-MurF) que catalizan la formación de uridina difosfato con N-acetilmurámico (UDP-M) y con N-acetilglucosamina (UDP-G) (MurA y MurB) y después añaden los cinco aminoácidos en el UDP-M (MurC a MurF). La secuencia peptídica varía dependiendo de la especie bacteriana pero termina siempre en D-alanina-D-alanina. La molécula soluble, UDP-M-pentapéptido, se asocia a la membrana bacteriana debido a la acción de MraY, una proteína transmembrana que cataliza su unión a un fosfolípido. Sobre esta molécula, que se conoce como Lípido I, actúa posteriormente MurG, una transferasa que

añade un grupo soluble UDP-G. Con estas reacciones se finaliza la síntesis del Lípido II, el precursor disacarídico para la biosíntesis del PG y sustrato para las proteínas fijadoras de penicilina (PBPs). En este punto el Lípido II continúa en el citoplasma, siendo necesario su transporte a la membrana interna por una serie de proteínas. Una vez en la membrana interna, el Lípido II es polimerizado y entrecruzado por las PBPs (9, 10).

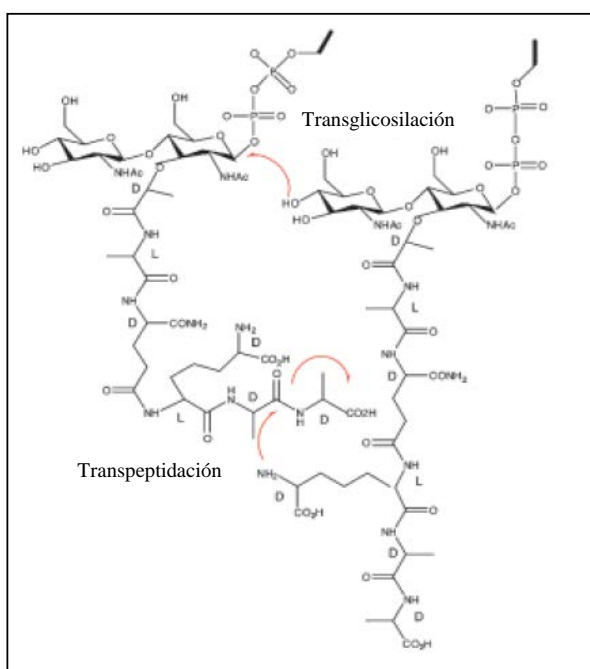


FIGURA 2: Esquema del mecanismo de los eventos de transglicosilación y transpeptidación. Figura adaptada de Macheboeuf y col (9)

La familia de proteínas conocida como PBPs son las responsables del montaje, el mantenimiento y la regulación de las características de la estructura del PG. Las PBPs catalizan la polimerización de la cadena de glicano (transglicosilación) y la unión entre las cadenas de glicano, mediante la transpeptidación de los aminoácidos (Figura 2). Algunas PBPs pueden hidrolizar la última D-alanina del pentapéptido (DD-carboxipeptidación) o hidrolizar el enlace peptídico que conecta dos cadenas de glicanos (endopeptidación)

(11). La actividad carboxipeptidasa explica que en el PG maduro existan tetrapéptidos y tripéptidos. Estas proteínas están ancladas en la membrana interna con sus sitios activos orientados hacia el espacio periplásmico. Hay dos grupos de PBPs, las PBPs de bajo peso molecular y las de alto peso molecular, cada una de ellas se divide en 3 clases en función de la similitud de su secuencia aminoacídica. Con la excepción de una proteína que se ha descrito como zinc dependiente, las restantes proteínas conocidas pertenecen al grupo de proteínas serina dependientes. El motivo de que estas proteínas reciban la denominación de proteínas fijadoras de penicilina, es debido a que son modificadas covalentemente por las penicilinas en su sitio activo de serina, provocando su inactivación con una unión bastante estable comparada con la que forman las  $\beta$ -lactamasas, quedando la bacteria privada de sus funciones esenciales (11).



### 1.3. Propagación de la resistencia

#### 1.3.1. Mecanismos de intercambio genético:

Existen cuatro formas de captación de material genético en bacterias:

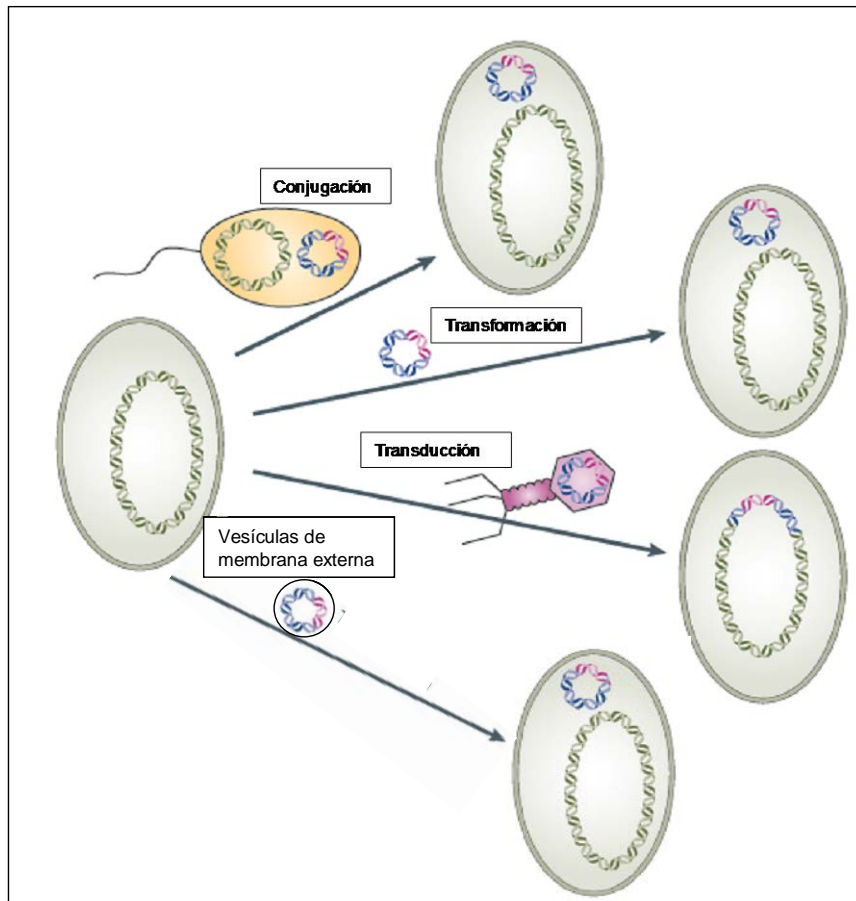


FIGURA 3: Mecanismos de intercambio genético. Figura adaptada de Andersson y col 2010 (1)

##### 1.3.1.1. Transformación

Se define como la adquisición de ADN (Ácido desoxirribonucleico) por parte de una célula a partir de ADN libre en el ambiente. Una vez dentro de la bacteria el ADN podrá mantenerse como tal cuando se trate de un elemento autónomo, o bien integrarse en el genoma del huésped por recombinación. Para que este proceso tenga lugar, es necesario que las células sean competentes, entendiendo el estado de competencia como aquel en el que las bacterias permiten que el ADN se una a su superficie y penetre en el interior de la célula favoreciéndose la adquisición de nuevos genes. La eficiencia de la transformación depende, en la naturaleza, de la existencia de proteínas de membrana que permitan la incorporación de ADN al interior celular.

### 1.3.1.2. Transducción

Durante la transducción un bacteriófago transfiere los genes entre bacterias compatibles. Es el método más restringido y específico, ya que la interacción entre el bacteriófago y el receptor bacteriano va a determinar el rango del huésped. Clínicamente, sólo tiene importancia en la transmisión de genes de resistencia de cocos Gram-positivos, fundamentalmente *S. aureus* (12).

### 1.3.1.3. Conjugación

La conjugación es la vía principal de diseminación de genes de resistencia entre las poblaciones bacterianas. Éste es el mecanismo de intercambio de genes más importante entre las bacterias Gram-negativas. Para que se produzca es imprescindible que las bacterias estén en contacto directo entre sí y por lo tanto es muy frecuente que ocurra entre bacterias que comparten nicho biológico. En los microorganismos Gram-negativos participa en el proceso un “pilus conjugativo” a través del cual se produce el intercambio de material genético (13, 14).

### 1.3.1.4. Transmisión a través de vesículas de membrana externa

Este mecanismo de intercambio genético es el más novedoso y su implicación en la diseminación de genes de resistencia a antibióticos ha sido descrita recientemente (15). Las vesículas de membrana externa (OMVs) son nanovesículas esféricas con un diámetro de entre 20 y 200 nm. Estas OMVs transportan lípidos y proteínas y también son capaces de transportar ADN de doble cadena, lo cuál se demostró en un ambiente microbiológicamente complejo como es el rumen (16). Además también se ha descrito la transferencia de genes de virulencia desde *E. coli* O157:H7 a otras bacterias entéricas sugiriendo que las OMVs podrían actuar como un sistema de transferencia de material genético de unos microorganismos a otros (17). Más recientemente, en el año 2011, se describió como un sistema de transferencia con impacto clínico al estar implicado en la diseminación de genes de resistencia a antibióticos, concretamente a carbapenémicos, en la bacteria *Acinetobacter baumannii* (15).

### 1.3.2. Elementos de transferencia horizontal en enterobacterias

El principal factor que ha favorecido la aparición de microorganismos multirresistentes tanto en bacterias Gram-negativas, como en Gram-positivas es la transferencia horizontal de genes (18) a través de diferentes elementos móviles que detallamos a continuación.

#### 1.3.2.1. Plásmidos

Los plásmidos son moléculas autorreplicables de ADN extracromosómico que se componen de una región constante que contiene los genes responsables de funciones esenciales como la replicación, el mantenimiento y la transferencia y una región variable donde se localizan los genes responsables de funciones adaptativas. Los genes que contienen no son imprescindibles para la supervivencia de la bacteria pero le confieren ventajas evolutivas. Los plásmidos clásicos son circulares y de doble cadena, y su tamaño varía desde una hasta varios cientos de kilobases (Kb).

La clasificación de los plásmidos se ha realizado en base a diferentes criterios como el número de copias, el rango de hospedador, el grupo de incompatibilidad y su capacidad de transferencia entre las células. Esta última característica permite diferenciar entre plásmidos conjugativos (transmisibles por ellos mismos) y plásmidos movilizables (transmisibles sólo en presencia de funciones conjugativas adicionales). El evento de conjugación está mediado por plásmidos conjugativos que portan un conjunto de genes *tra* que son los responsables de que se produzca la conjugación de la bacteria que los hospeda con la receptora. Los transconjugantes obtenidos adquieren las propiedades de la bacteria donadora. La persistencia y evolución de estos elementos se ve favorecida por la presencia de genes que confieren resistencia a diversas familias de antibióticos ( $\beta$ -lactámicos, quinolonas, tetraciclinas, aminoglucósidos u otros), a metales pesados (mercurio, arsénico o plata) y/o genes que codifican la producción de factores de virulencia (19).

El número de copias de un plásmido puede variar, dependiendo del tipo, desde una sola copia hasta centenares por célula.

Los plásmidos pueden tener distinto rango de hospedador, lo que determina su diseminación en diferentes especies (20). Algunos plásmidos pueden presentar un rango de huéspedes muy reducido, mientras que otros son capaces de transferirse y replicarse en un gran número de especies bacterianas. Una bacteria puede contener más de un plásmido, pero

no todos los plásmidos pueden coexistir en una misma célula: existe una incompatibilidad plasmídica. En esta característica de incompatibilidad están las bases para la clasificación inicial de algunos plásmidos que aún es utilizada hoy en día. Se han definido grupos de incompatibilidad para los plásmidos de los miembros de la familia Enterobacteriaceae (27 grupos), *Pseudomonas* (14 grupos), y para estafilococos (18 grupos) (14).

### 1.3.2.2. Secuencias de inserción

Las secuencias de inserción (IS) son elementos genéticos constituidos por secuencias cortas de ADN que codifican la síntesis de una transposasa y están flanqueadas por secuencias repetidas e inversas (IR). La información depositada en la base de datos “ISfinder” (<http://www-is.biotoul.fr/is.html>) demuestra la gran diversidad de IS, su distribución y ubicuidad en plásmidos y genomas ya secuenciados. Actuando como secuencias homólogas repetitivas, estos elementos están implicados en delecciones, inversiones o reorganizaciones del genoma bacteriano. El grupo mayoritario de IS se caracteriza por poseer una secuencia aminoacídica conservada de tipo DDE e incluir numerosas familias (21). Las de la familia *IS110*, a la cual pertenecen *ISEcp1*, *IS1111* e *IS5075* parecen ser recombinasas sitio-específicas mientras que los sitios activos para otras IS no han sido identificados.

Otro grupo de IS más inusual lo constituyen los elementos ISCR que presentan semejanzas con la familia *IS91* tanto en estructura como en función. Difieren de las clásicas IS en que sus secuencias terminales son diferentes, en lugar de ser secuencias invertidas repetidas. Además, a sus transposasas les falta el motivo aminoacídico DDE y no generan en su inserción secuencias repetidas. Hasta ahora hay 19 miembros que pertenecen a la familia ISCR que se pueden encontrar en la página web: <http://medicine.cf.ac.uk/infect-immun/research/infection/antibacterial-agents/iscr-elements/> y, la mayoría de ellas, se han hallado acompañando a genes de resistencia antibiótica (22, 23).

### 1.3.2.3. Transposones

Los transposones son segmentos de ADN de mayor tamaño que las secuencias de inserción, capaces de insertarse en múltiples lugares del ADN diana. Contienen el gen de la transposasa, responsable de su movilización y uno o varios genes entre los que se encuentran

los de resistencia a antibióticos. Se han definido cuatro clases de transposones en enterobacterias según sus características estructurales y su mecanismo de transposición: a) transposones compuestos o transposones de clase I, b) transposones de clase II, c) transposones de la familia Tn5090-Tn7 y d) transposones conjugativos, siendo las tres primeras clases las que se encuentran con mayor frecuencia en Enterobacteriaceae:

a) La estructura de los **transposones de clase I o transposones compuestos** consiste en dos copias de una secuencia de inserción con la misma o distinta orientación, que flanquean un número variable de genes con diferentes funciones, principalmente de resistencia a antibióticos o funciones catabólicas, y que contribuyen a la transposición (24).

b) Los **transposones de clase II** son los más prevalentes en enterobacterias y están compuestos por una transposasa, una resolvasa, un fragmento de ADN de tamaño variable, todo ello flanqueado por dos IRs. Dentro de estos transposones se han definido dos subgrupos dependiendo de la orientación de la transposasa y resolvasa. Se encuentran los derivados de Tn3, cuya transposasa y resolvasa se transcriben en dirección opuesta, y los derivados de Tn21 en los que estos genes se transcriben en la misma dirección.

c) Entre los **transposones de la familia Tn5090-Tn7** se engloba el transposón mercurial Tn5090. Se caracterizan por un mecanismo de transposición replicativa en dos pasos que incluye la formación de cointegrados y su resolución en un sitio *res*. Se diferencian de los transposones Tn3 en que la formación de cointegrados requiere la acción de varios genes en lugar de uno solo (25).

d) Los **transposones conjugativos** (CTn) engloban elementos genéticos muy diversos que también se conocen como “elementos integrativos-conjugativos” con capacidad de autotransferencia e integración en el cromosoma bacteriano y, menos frecuentemente, en plásmidos. Los CTn han sido implicados en la diseminación de resistencia a antibióticos, principalmente tetraciclina y macrólidos. Se han identificado en una gran variedad de microorganismos Gram-positivos y Gram-negativos aunque su frecuencia es mucho mayor entre los primeros. El representante más emblemático de este grupo es Tn916 (confiere resistencia a tetraciclina), inicialmente identificado en *Enterococcus faecalis* y posteriormente en Enterobacteriaceae y *Pseudomonas* (26).

Las consecuencias de la adquisición de un transposón o una IS pueden ser muy serias y devastadoras. Sin embargo, a veces puede conferir ventajas debido al efecto que determinadas inserciones pueden proporcionar para combatir los antibióticos (18).

#### 1.3.2.4. Integrones

Los integrones son elementos dinámicos que contienen los determinantes genéticos de los componentes de un sistema de recombinación específica de sitio que es capaz de reconocer, capturar y expresar genes en *cassettes* que son elementos móviles que consisten en un gen carente de promotor (típicamente de resistencia a antibióticos o desinfectantes) y un sitio de recombinación específica (27).

La estructura mínima de un integrón incluye el gen *int* que codifica una integrasa de la familia de las tirosina-recombinasas, un sitio primario de recombinación (*attI*) y un promotor (*Pc*), que asegura la expresión de los genes *cassettes*. Estos elementos están situados en el segmento 5'conservado (5'CS). Algunos tipos de integrones presentan una región 3'conservada (3'CS), constituida por un gen de resistencia a compuestos de amonio cuaternario (*qacEAI*), un gen de resistencia a sulfamidas (*sulI*) y una secuencia de función desconocida (*orf5*). Se han descrito una gran variedad de genes *cassettes*. Su localización y su número dentro de los integrones es muy variable debido a deleciones, reorganizaciones o inserciones.

Podemos clasificarlos en dos grandes grupos, a) integrones móviles, que codifican con frecuencia genes de resistencia a antibióticos y son los más relevantes a nivel clínico y b) el de los integrones presentes en el cromosoma bacteriano (también denominados superintegrones), sólo esporádicamente asociados a determinantes de resistencia (28, 29). Dentro de los integrones móviles, los de clase I son los más prevalentes en aislamientos clínicos y se hallan altamente asociados con bacilos Gram-negativos multirresistentes.

### 1.4. Antibióticos $\beta$ -lactámicos

#### 1.4.1. Aspectos generales y mecanismo de acción

Los antibióticos  $\beta$ -lactámicos constituyen la familia más numerosa de antimicrobianos y la más utilizada en la práctica clínica. La importancia del descubrimiento de Alexander Fleming en 1928 del primer antibiótico de éxito terapéutico producido por el hongo *Penicillium notatum*, significó el inicio de la edad de oro de los antimicrobianos. La Penicilina G (bencilpenicilina) comenzó a usarse en la clínica en 1942, revolucionando el tratamiento de las enfermedades infecciosas en la primera mitad del siglo XX (30). En la

actualidad, muchos años más tarde, los  $\beta$ -lactámicos siguen siendo los antimicrobianos más prescritos, tanto a nivel comunitario como en los hospitales, debido a que tienen un amplio espectro bacteriano y presentan baja toxicidad en humanos (31). La presencia de un anillo  $\beta$ -lactámico define químicamente a esta familia de antibióticos y es esencial para la actuación del antibiótico, pero aislado carece de actividad antimicrobiana y necesita ser activado por otros radicales para unirse a las PBPs, las dianas donde ejerce su acción. La naturaleza de los radicales esenciales que se unen al anillo  $\beta$ -lactámico define las diferentes clases de antibióticos  $\beta$ -lactámicos. Lo habitual es que se unan anillos heterocíclicos, es decir formados por distintos átomos. Además, estos esqueletos básicos formados por los anillos pueden unir diferentes cadenas laterales lineales o cíclicas en las distintas posiciones que admiten sustitución química, que varían según los núcleos. Estas cadenas laterales complementan, a veces de forma muy importante, las características antimicrobianas, el espectro, la actividad, su resistencia a  $\beta$ -lactamasas y las farmacocinéticas (32).

La unión  $\beta$ -lactámico-PBP inhibe o disminuye la formación de enlaces entre las cadenas de PG, que junto con la liberación de autolisinas hace que la bacteria acabe lisándose (33).

### **1.5. Mecanismos de resistencia a los antibióticos $\beta$ -lactámicos**

Las bacterias pueden desarrollar resistencia a los  $\beta$ -lactámicos por varios mecanismos, que en ocasiones se encuentran asociados. Los mecanismos implicados pueden ser los siguientes (34) (Figura 4):

#### **1.5.1. Modificación de las dianas**

Las alteraciones en las PBPs pueden implicar una pérdida de afinidad por los  $\beta$ -lactámicos con la consiguiente disminución de su actividad (35). Este mecanismo afecta fundamentalmente a cocos Gram-positivos. Un ejemplo de estas modificaciones es la PBP2a presente en *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina. La PBP2a está codificada por el gen *mecA* y se adquiere a través de transferencia horizontal. También se encuentran estas alteraciones en las PBPs de los *Enterococcus* spp. que son naturalmente resistentes a antibióticos  $\beta$ -lactámicos debido a la presencia de una PBP con baja afinidad por la penicilina y sus análogos. Un ejemplo concreto de este caso lo encontramos en *Enterococcus faecium* con PBP5fm, cuya sobreproducción puede conducir al microorganismo al desarrollo de altos niveles de resistencia (9, 35).

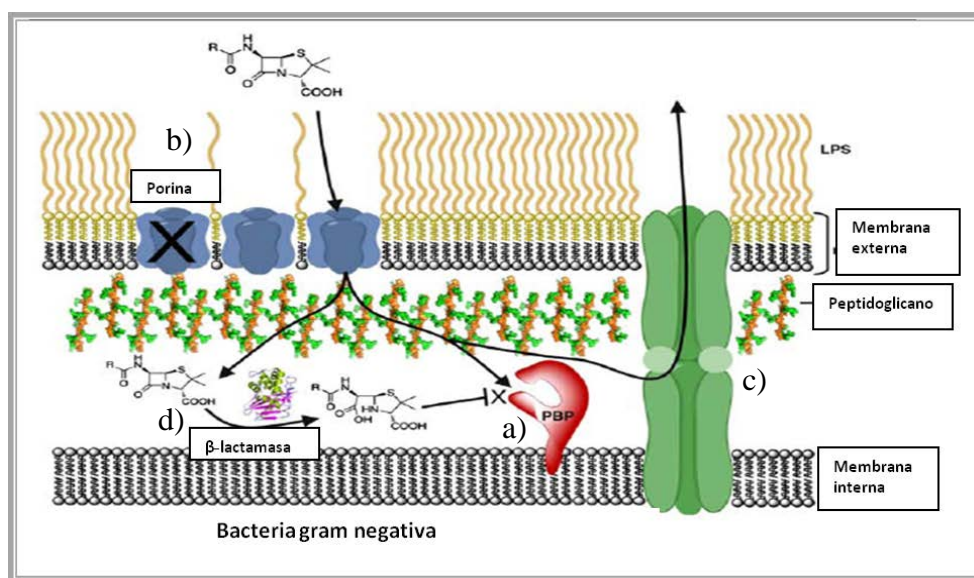


FIGURA 4: Esquema de la composición de la pared celular de las bacterias Gram-negativas y de los diferentes mecanismos de resistencia a  $\beta$ -lactámicos. Figura adaptada de Llarrull y col, 2010 (34). a) Modificación de las dianas, b) alteraciones de la permeabilidad, c) sistemas de expulsión y d) producción de enzimas hidrolíticas

### 1.5.2. Alteraciones de la permeabilidad

En los microorganismos Gram-positivos la única barrera que se opone a la entrada del antibiótico es el PG, que normalmente es permeable a los  $\beta$ -lactámicos. En cambio, en los microorganismos Gram-negativos, la membrana externa supone una barrera adicional. En condiciones normales estos antibióticos penetran a través de la membrana externa de las bacterias Gram-negativas gracias a canales proteicos específicos llamados porinas. Las porinas son proteínas que forman canales llenos de agua embebidos en la membrana externa que regulan la entrada de algunos elementos, generalmente compuestos hidrófilos y de pequeño tamaño, entre ellos la mayoría de los  $\beta$ -lactámicos. Los cambios en su número, conformación, o pérdida total pueden llevar a que la membrana externa no permita el paso de estos agentes al espacio periplasmático, lo que está determinado por mutaciones en genes cromosómicos. Se ha descrito la reducción en la cantidad de porinas como un factor importante que contribuye a la resistencia a imipenem en Enterobacteriaceae. Esta resistencia es muy preocupante en la actualidad ya que muchas de estas cepas ya sólo presentan sensibilidad a antibióticos carbapenémicos. Las principales porinas cuya



disminución, junto con la presencia de  $\beta$ -lactamasas, provocan resistencia a imipenem son la OmpK35 y la OmpK36 en *Klebsiella pneumoniae* y la OmpC en *E. coli*, *E. cloacae*, *Enterobacter aerogenes* y *Citrobacter freundii* (36). Hay numerosos casos en los que se describe la disminución de sensibilidad a antibióticos carbapenémicos cuando la pérdida de porinas se combina con la presencia de distintas  $\beta$ -lactamasas (37-39).

### 1.5.3. Sistemas de expulsión

Las bombas de expulsión son complejos enzimáticos de membrana, que expulsan detergentes y sustancias anfipáticas de la célula que de otra manera podrían dañar a la bacteria. Entre las sustancias que son capaces de expulsar también se encuentran los antibióticos. Para ello, utilizan la hidrólisis de ATP o un mecanismo de contra-transporte iónico como sustrato energético. Los genes que codifican estas bombas de expulsión se encuentran en el cromosoma bacteriano y tienen una disposición y estructura conservada, así como una expresión estrictamente regulada. El principal papel de este mecanismo es mantener bajas las concentraciones de sustancias tóxicas dentro de la célula (40, 41). Muchas veces se producen mutaciones que conducen al incremento de la expresión de bombas que expulsan antibióticos (42). En *E. coli* y *E. cloacae* se ha descrito el sistema de expulsión AcrAB-TolC, donde TolC es una porina compartida con otros sistemas exportadores celulares (43).

### 1.5.4. Producción de enzimas $\beta$ -lactamasas

Actualmente las  $\beta$ -lactamasas están ampliamente distribuidas tanto en bacterias Gram-negativas como en bacterias Gram-positivas e inactivan a las penicilinas y a las cefalosporinas a través de la hidrólisis del anillo  $\beta$ -lactámico. Este tema es desarrollado con más detalle en los siguientes apartados.

## 1.6. $\beta$ -lactamasas

La hidrólisis enzimática es el mecanismo de resistencia mayoritario frente a los antibióticos  $\beta$ -lactámicos en las bacterias Gram-negativas causantes de infecciones, y está causada por la presencia de  $\beta$ -lactamasas en el espacio periplásmico. El grado de resistencia

que generan estas enzimas se correlaciona con su concentración, afinidad por los diferentes  $\beta$ -lactámicos y sus propiedades hidrolíticas (7).

### 1.6.1. Clasificación general

Se han propuesto diferentes esquemas de clasificación de  $\beta$ -lactamasas en función de la estructura y de la función de la proteína. La clasificación molecular, también conocida como clasificación de Ambler, es la más sencilla y menos controvertida ya que está basada en las secuencias aminoacídicas. Esta clasificación divide a las  $\beta$ -lactamasas en enzimas de clase A, C y D que necesitan un aminoácido de serina para llevar a cabo su actividad hidrolítica y en enzimas de clase B, llamadas metaloenzimas, que requieren un ión de Zinc divalente (44).

Otra clasificación es la funcional de Bush y Jacoby (45) que relaciona las enzimas con su patrón de resistencia e inhibición siendo más útil a nivel clínico y microbiológico ya que refleja la resistencia selectiva a diferentes clases de antibióticos  $\beta$ -lactámicos y diferentes patrones de inhibición. Esta clasificación es la más utilizada y distingue tres grupos (Tabla 1):

**Grupo 1:** cefalosporinasas. Este grupo corresponde a la clase C de Ambler e incluye enzimas codificadas en el cromosoma y plásmidos, principalmente, de muchas Enterobacteriaceae con actividad cefalosporinasa que no son inhibidas por inhibidores de  $\beta$ -lactamasas como el ácido clavulánico.

**Grupo 2:** serina  $\beta$ -lactamasas. Este grupo incluye enzimas pertenecientes a las clases A y D de Ambler. Es un grupo heterogéneo de enzimas de amplio espectro de sustrato (penicilinas, cefalosporinas, oxacilinasas y carbapenemasas) inhibidas por inhibidores clásicos de  $\beta$ -lactamasas (ácido clavulánico, tazobactam). Se divide en diferentes subgrupos, uno de los cuales (2be) incluye las  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE).

**Grupo 3:** metalo- $\beta$ -lactamasas (MBLs). Corresponde a la clase B de Ambler que al requerir el átomo metálico de  $\text{Zn}^{+2}$ , se inhiben por agentes quelantes como el EDTA. A diferencia de otras carbapenemasas, no son inhibidas por el ácido clavulánico y no hidrolizan monobactámicos.

Tabla 1: Clasificación molecular y funcional de las  $\beta$ -lactamasas, Ambler, 1980 (44); Bush y Jacoby, 2009 (45).

Bush-Jacoby	Ambler	Sustrato preferencial	Inhibidos por:		Características	$\beta$ -lactamasas
			CLAV/TZ	EDTA		
1	C	Cefalosporinas	No	No	Mayor hidrólisis de cefalosporinas que de bencilpenicilinas. Hidrólisis de cefamicinas.	AmpC, P99, ACT-1, CMY-2, FOX-1, MIR-1, GCC1, CMY-37
1e	C	Cefalosporinas	No	No	Hidrólisis incrementada de ceftazidima y de otros oximiino-beta-lactámicos	GC1, CMY-37
2 a	A	Penicilinas	Sí	No	Mayor hidrólisis de bencilpenicilinas que cefalosporinas.	PC1
2 b	A	Penicilinas, cefalosporinas de 1ª generación	Sí	No	Hidrólisis similar de bencilpenicilinas y de cefalosporinas.	TEM-1, TEM-2, SHV-1
2 be	A	Cefalosporinas 1ª-4ª generación, monobactam.	Sí	No	Hidrólisis elevada de oximiino-beta-lactámicos (CTX, CAZ, CZT, PM, AZT)	TEM-3, SHV-2, CTX-M-15, PER-1, VEB-1
2 br	A	Penicilinas	No	No	Resistentes a CLAV, Sulbactam y TZB	TEM-30, SHV-10
2 ber	A	Cefalosporinas 1ª-4ª generación, monobactam	No	No	Hidrólisis elevada de oximiino-beta-lactámicos y resistencia a CLAV	TEM-50
2c	A	Carbenicilina	Sí	No	Hidrólisis elevada de carbenicilina	PSE-1, CARB-3
2 ce	A	Carbenicilina, cefepima	Sí	No	Hidrólisis elevada de carbenicilina, cefepima y cefpiroma	RTG-4
2 d	D	Cloxacilina	Variable	No	Hidrólisis elevada de cloxacilina y oxacilina	OXA-1, OXA-10
2 de	D	Cefalosporinas 1ª-4ª generación	Variable	No	Hidrólisis de cloxacilina, oxacilina y oximiino-beta-lactámicos	OXA-11, OXA-15
2 df	D	Carbapenemas	Variable	No	Hidrólisis de cloxacilina, oxacilina y carbapenemas	OXA-23, OXA-48
2 e	A	Cefalosporinas 1ª-4ª generación	Sí	No	Hidrólisis de cefalosporinas	CepA
2 f	A	Carbapenemas	Variable	No	Hidrólisis elevada de carbapenemas, oximiino-beta-lactámicos y cefamicinas	KPC-2, IMI-1, SME-1
3 a	B	Carbapenemas	No	Sí	Hidrólisis de amplio espectro que incluye carbapenemasas pero no monobactámicos	IMP-1, VIM-1, CcrA, IND-1, LI, CAU-1, GOB-1, FEZ-1
3 b	B	Carbapenemas	No	Sí	Hidrólisis de carbapenemas	CphA, Sfh-1

### 1.6.2. Origen de las $\beta$ -lactamasas

Es ampliamente aceptado que las  $\beta$ -lactamasas evolucionaron a partir de PBPs ancestrales implicadas en la biosíntesis y el mantenimiento del PG bacteriano. Gracias a la disponibilidad de gran cantidad de secuencias, tanto de PBPs como de  $\beta$ -lactamasas, se ha podido realizar un análisis para intentar describir la relación evolutiva entre ellas. La afirmación de que fueron pasos evolutivos independientes los que dieron lugar a las diferentes clases de  $\beta$ -lactamasas está adquiriendo mayor fuerza, debido a algunos estudios de función y de comparación

estructural. Aunque en principio no se tenía muy clara la evolución de las  $\beta$ -lactamasas de clase B, debido a que son zinc dependientes y no poseen el átomo de serina, se realizó la comparación de su estructura con las de las otras clases y sorprendentemente se observó que las estructuras de las enzimas consistían en la presencia de dos subdominios con un pliegue

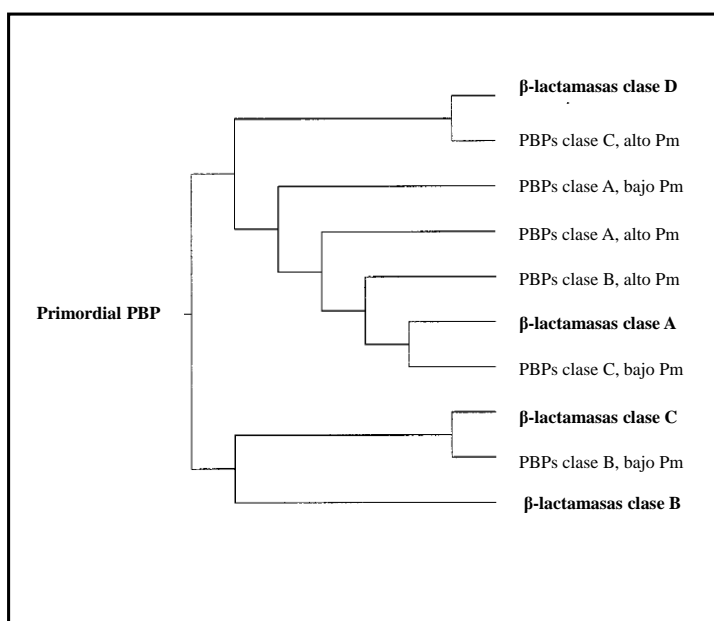


FIGURA 5. Esquema simplificado del alineamiento de diferentes  $\beta$ -lactamasas y PBPs. Pm: Peso molecular. Figura modificada de Massova y col (46)

similar. Este hecho determinó un posible origen común de todas las  $\beta$ -lactamasas a partir de una PBP ancestral primordial, tal como se muestra en la Figura 5 (46). Además, también se han encontrado cambios estructurales que supuestamente han desembocado en la pérdida de las actividades enzimáticas propias de las PBPs y en la adquisición de las funciones que poseen actualmente las  $\beta$ -lactamasas (47). Se ha sugerido que antiguamente la secreción de proteínas PBP funcionó como un mecanismo de defensa ante la presencia de antibióticos  $\beta$ -lactámicos en el medio. La mejora de este mecanismo de detoxificación habría dado lugar a enzimas específicos sin actividad transpeptidasa pero capaces de hidrolizar a los antibióticos  $\beta$ -lactámicos. Sin embargo, hay escasas evidencias experimentales que demuestren actividad  $\beta$ -lactamasa residual (48).

### 1.6.3. $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE)

Las BLEE incluyen enzimas pertenecientes a la clase A de Ambler y, funcionalmente, al grupo 2be y enzimas de la familia OXA que pertenecen a la clase D de Ambler y al grupo funcional 2de (Tabla 1). Se clasifican según su secuencia de aminoácidos en diferentes familias. Aunque existen diferencias en la prevalencia de las distintas familias, las mayoritarias son las de tipo TEM, SHV y CTX-M, seguidas de OXA, PER y VEB. Otras BLEE aisladas menos frecuentemente son SFO, TLA, GES, IBC y BEL. Estas enzimas derivan de genes cromosómicos que han sufrido mutaciones, movilización e integración en diferentes estructuras genéticas, siendo la mayoría de ellas codificadas por plásmidos (49). Una definición usada frecuentemente para las BLEE es que son enzimas  $\beta$ -lactamasas capaces de conferir resistencia bacteriana a penicilinas, cefalosporinas de primera, segunda y tercera generación y aztreonam (pero no a cefamicinas o carbapenemes), por hidrólisis de estos antibióticos y que son inhibidos por inhibidores de  $\beta$ -lactamasas como el ácido clavulánico (45, 49).

La primera  $\beta$ -lactamasa codificada en un plásmido en bacterias Gram-negativas fue la TEM-1, descrita en 1965 en una cepa de *E. coli* aislada a partir de un hemocultivo de una paciente en Grecia (50). Debido a su naturaleza plasmídica, esta enzima pronto se expandió a otros miembros de la familia Enterobacteriaceae, *Haemophilus influenzae*, *Neisseria gonorrhoea* y *Pseudomonas aeruginosa*. Al mismo tiempo, otra enzima  $\beta$ -lactamasa codificada en un plásmido, SHV-1, fue encontrada en *K. pneumoniae* y en *E. coli*. El hallazgo de estas enzimas que destruyen penicilina dio lugar al desarrollo de nuevos antibióticos  $\beta$ -lactámicos estables ante la presencia de las  $\beta$ -lactamasas TEM-1 y SHV-1, las oximiino-cefalosporinas. Sin embargo, la resistencia a estos antibióticos también acabó apareciendo; la primera  $\beta$ -lactamasa con habilidad para hidrolizar estos compuestos fue descrita en 1985 a partir de un aislado de *K. pneumoniae* en Alemania y fue denominada SHV-2. Debido a que esta enzima degradaba los antibióticos  $\beta$ -lactámicos de “espectro extendido”, ésta y las que más tarde aparecerían con la misma capacidad, se designaron como “ $\beta$ -lactamasas de espectro extendido”, BLEE (51).

El primero y a su vez más amplio subgrupo 2be, descrito en el año 1985, se originó por sustituciones aminoacídicas en TEM-1, TEM-2 y SHV-1 que ampliaron el espectro de sustratos, siendo la mayoría de ellas ceftazidimasas y sólo unas pocas cefotaximasas. Las BLEE de las familias TEM y SHV comprenden, al menos, 202 y 167 miembros respectivamente (<http://www.lahey.org/Studies>) y tienen una distribución mundial.

Más recientemente se han descrito otras BLEE no-TEM y no-SHV mediadas por plásmidos, las ceftazidimasas de tipo PER, VEB, TLA-1 y GES entre otras y las cefotaximasas de tipo SFO-1, BES-1 y, sobre todo, las pertenecientes al grupo de las CTX-M, que es el mayoritario actualmente. Las BLEE tipo CTX-M son las enzimas más extendidas mundialmente. Fueron descritas por primera vez a finales de la década de los 80 y experimentaron una proliferación muy rápida y extensa desde el año 1995 tanto en amplias áreas geográficas como entre un gran número de bacterias, particularmente de la familia Enterobacteriaceae (52).

Las enzimas de la familia CTX-M tienen actividad hidrolítica frente a oxiimino-cefalosporinas y aztreonam pero no frente a cefamicinas como cefoxitina y son susceptibles a los inhibidores de  $\beta$ -lactamasas (ácido clavulánico, sulbactam, tazobactam). Normalmente, son más activas contra cefotaxima que contra ceftazidima, pero algunas mutaciones pueden incrementar su actividad contra la ceftazidima. Hasta ahora se han encontrado 121 CTX-M diferentes, publicadas en <http://www.lahey.org/Studies/other.asp>. Se encuentran clasificadas, en función de la homología de sus respectivas secuencias aminoacídicas, en cinco grupos: CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9 y CTX-M-25. Estas enzimas muestran tan sólo un 40 % de similitud con las  $\beta$ -lactamasas tipo TEM y SHV. Sin embargo, los genes *bla*<sub>CTX-M</sub> poseen un alto grado de similitud con los genes cromosómicos que codifican las  $\beta$ -lactamasas del género *Kluyvera* (52).

Hoy en día son las BLEEs más prevalentes en todo el mundo (49, 53), tanto en el medio intra como extrahospitalario, considerándose endémicas en Sudamérica, Europa mediterránea y del este y Asia (54).

La BLEE más distribuida mundialmente es la CTX-M-15, que fue identificada inicialmente en un aislamiento de la India en 1999 y después se convirtió en la enzima más ampliamente distribuida en el mundo (54). Esta enzima muestra la característica de hidrolizar mejor la ceftazidima que la cefotaxima (55).

En España el grupo de las CTX-M representa el 75 % del total de BLEEs detectadas, siendo las más frecuentes las de los grupos CTX-M-9 (CTX-M-9 y -14) y CTX-M-1 (CTX-M-1, -10, -15 y -32) (56). Las CTX-M son también las BLEE más prevalentes aisladas en Galicia y, dentro de ellas, la CTX-M-14 y la CTX-M-15, con un porcentaje del 51 % y un 18 % respectivamente, son las mayoritarias en aislamientos de *E. coli* (57-59).

En el año 1991, en Turquía y, más tarde, en Francia, se hallaron oxacilinasas que conferían un fenotipo similar a las BLEE, pero con una inhibición por ácido clavulánico menor. Éstas fueron reconocidas como mutantes de  $\beta$ -lactamasas de tipo OXA de amplio espectro, la mayoría eran OXA-10. Estas variantes han sido encontradas por todo el mundo, incluyendo Europa, y están principalmente asociadas con *P. aeruginosa* (60).

Cabe destacar también que en estudios realizados en varios países Europeos (incluyendo España, Italia, Grecia, Inglaterra y Canadá) se ha apreciado una tendencia alarmante de resistencia asociada a otras clases de agentes antimicrobianos, diferentes a los  $\beta$ -lactámicos, entre los microorganismos productores de BLEE (61).

#### **1.6.4. Dispersión de BLEE**

La dispersión tan efectiva de las BLEE a lo largo de estos años se ha producido por dos mecanismos, bien por diseminación de una determinada cepa (diseminación clonal) o por la presencia de estos genes en diferentes plataformas genéticas de transferencia horizontal como secuencias de inserción, transposones y plásmidos (diseminación horizontal a través de elementos móviles) (62).

También se ha observado, en algunos hospitales, un cuadro epidemiológico más complejo en el que aparecen combinados ambos mecanismos. Recientes artículos han descrito la presencia de diseminación clonal de al menos 5 cepas diferentes de *Klebsiella* productoras de BLEE en el mismo servicio y al mismo tiempo. Además, miembros de un mismo clon podrían portar diferentes plásmidos (que codifiquen diferentes genes de BLEE) y cepas no relacionadas epidemiológicamente podrían producir la misma BLEE debido a la transferencia del plásmido entre diferentes especies (49).

##### **1.6.4.1. Diseminación clonal**

Uno de los principales factores que intervienen en la actual prevalencia de enterobacterias productoras de BLEE es la diseminación clonal. El ejemplo más representativo es la reciente y rápida diseminación global de un clon de *E. coli* O25:H4-ST131 que causó infecciones urinarias y está asociado con la diseminación pandémica del gen *bla*<sub>CTX-M-15</sub>. Este clon se ha detectado en diferentes países como Canadá, España, Francia, Grecia, Italia, Portugal, India, Kuwait, Nigeria y Suiza (63-65). Otros clones responsables de

la expansión de BLEE como *E. coli*-ST23, *E. coli*-ST10 ó *E. coli*-ST359 son identificados principalmente como productores de CTX-M-14 en España (66, 67). Estos hallazgos sugieren que la adquisición de clones de *E. coli* productores de BLEE contribuye a la diseminación y persistencia de las BLEE (66).

En la especie *Klebsiella* también se han producido diseminaciones clonales. En Grecia, una cepa endémica productora de SHV-5, que apareció en la década de los 90, ha adquirido recientemente el plásmido que codifica la carbapenemasa VIM-1, constituyendo una grave amenaza y ampliando su expansión clonal a Francia (68). En Corea se ha descrito una amplia expansión clonal de una cepa de *K. pneumoniae* productora de SHV-12, causando problemas epidemiológicos (69). Una de las más preocupantes es la del clon ST258 productor de la carbapenemasa KPC. En 2006, un aislamiento extremadamente resistente de *K. pneumoniae* productor de KPC-3 emergió en Israel (70), causando un brote con diseminación clonal a nivel nacional. Esta cepa se describió genéticamente relacionada con cepas de *K. pneumoniae* que produjeron brotes en varias zonas de Estados Unidos (71). Posteriormente, este clon también fue encontrado en otras muchas zonas del mundo como China, Israel, Europa y América del Sur (72-76).

Ejemplos representativos de expansión clonal en otras especies de enterobacterias incluyen una cepa de *Enterobacter aerogenes* ampliamente diseminada en hospitales europeos desde la década de los 90, la cual es responsable de la diseminación de TEM-24 en Bélgica, Francia, Portugal y España (77). Además, también se han descrito localmente diseminaciones clonales de cepas de *P. mirabilis*, *Shigella sonnei*, *Serratia marcescens* y *Klebsiella oxytoca* en Europa (66).

#### **1.6.4.2. Diseminación a través de elementos móviles, (plásmidos, transposones, integrones)**

La resistencia a antibióticos se incrementa rápidamente y se expande con gran celeridad, especialmente cuando los genes de resistencia son transferidos de forma horizontal por medio de plásmidos o integrones entre diferentes cepas, entre diferentes especies e incluso entre diferentes familias bacterianas (14, 78).

Los genes que codifican las BLEE se localizan frecuentemente en plásmidos que han ido evolucionando mediante la adquisición de nuevos genes de resistencia asociados a diferentes elementos genéticos como secuencias de inserción, integrones o transposones, lo



cual podría haber acelerado la evolución de la diversidad genética y la rápida expansión de los genes BLEE (79).

#### 1.6.4.2.1. Diseminación plasmídica

Actualmente, la alta prevalencia de los genes BLEE en diferentes regiones europeas se debe en gran medida a la transferencia horizontal de plásmidos entre clones no relacionados y entre clones epidémicos locales e internacionales. Los genes BLEE se han descrito en plásmidos de características variables en cuanto a su tamaño y en cuanto al hecho de que sean o no conjugativos.

Las  $\beta$ -lactamasas TEM-1, TEM-2 y SHV-1, así como sus derivados, las BLEE tipo TEM o SHV, se han descrito en plásmidos de un tamaño que oscila entre 80 y 300 Kb, de un número reducido de grupos de incompatibilidad: IncC, IncFI, IncFII, IncFIB, IncHI2 y IncL/M (80, 81). Las BLEE tipo CTX-M se han encontrado en plásmidos del grupo IncN o IncL/M (CTX-M-1), IncA/C2 (CTX-M-3), IncFII (CTX-M-15), e IncHI2, IncP1-alfa o IncFI (CTX-M-9) (82, 83).

Las BLEE CTX-M encontradas en aislamientos clínicos suelen estar localizadas en plásmidos de un tamaño variable, desde 7 Kb a 160 Kb.

El gen TEM-1 suele coexistir en el mismo plásmido con enzimas BLEE. También se han encontrado asociaciones de TEM-2 con enzimas de tipo OXA-1 y de tipo SHV. Estos plásmidos además pueden codificar otros genes de resistencia a otros antibióticos, incluyendo aminoglucósidos, cloranfenicol, sulfamidas, trimetropim y tetraciclina (52). Los plásmidos que codifican BLEE de tipo CTX-M suelen ser transferibles por conjugación y su frecuencia de transferencia varía desde  $10^{-7}$  a  $10^{-2}$  por célula donadora (84). Esta propiedad explica la fácil diseminación de la mayoría de los plásmidos que portan *bla*<sub>CTX-M</sub>, incluso en diferentes países. Un ejemplo lo encontramos en la cepa *E. coli* O25:H4-ST131 portadora del gen CTX-M-15, en la que además de la dispersión clonal descrita anteriormente, también se ha producido una dispersión plasmídica, ya que plásmidos portadores de la *bla*<sub>CTX-M-15</sub> han sido identificados en otros *E. coli* (ST405, ST354, ST28 y ST695), en una cepa de *S. sonnei* aislada en un paciente en la República Checa, en *Salmonella enterica* serovar Enteritidis en el Reino Unido y en una *K. pneumoniae* en España (20). Además, esta cepa, *E. coli* O25:H4-ST131, es capaz de adquirir distintos plásmidos encontrándose como productora de otras CTX-M (CTX-M-1, CTX-M-9, CTX-M-14), aunque en mucha menor proporción (57).

En *E. cloacae* también ha sido descrita diseminación plasmídica contribuyendo por ejemplo a la expansión de gen *bla*<sub>CTX-M-15</sub> y *bla*<sub>CTX-M-10</sub> entre diferentes aislados en un hospital de Túnez (85) y en un hospital de Madrid (86) respectivamente.

#### 1.6.4.2.2. Secuencias de inserción, transposones e integrones

Los genes BLEE pueden estar asociados a secuencias de inserción de distinto tipo (por ejemplo IS26, *ISEcp1*, *ISCRI*) y a transposones (Tn3, Tn402 entre otros) que se relacionan con su movilización y/o expresión (77, 87, 88).

La secuencia de inserción IS26 fue una de las primeras reconocidas por estar involucrada en la adquisición de genes de resistencia. IS26 presenta la habilidad de tener un alto número de copias en Enterobacterias lo que facilita la captura y la adquisición de genes. Fue responsable de algunas de las primeras resistencias a penicilinas en bacilos Gram-negativos debido a la captura del gen *bla*<sub>SHV</sub> desde el cromosoma de *K. pneumoniae* y su movilización a plásmidos, produciéndose a partir de éstos su dispersión a otros microorganismos (89). También se ha descrito la asociación de IS26 con distintos genes *bla*<sub>CTX-M</sub> (90, 91).

Otro elemento de movilización importante es la secuencia de inserción *ISEcp1*, que puede actuar en la movilización y como promotor en la expresión de genes *bla*<sub>CTX-M</sub>. Fue aislada por primera vez al lado de la *bla*<sub>CTX-M-15</sub> en una bacteria entérica en un hospital de Nueva Delhi (18, 82, 92).

Por otro lado, la secuencia de *ISCRI* se ha encontrado asociada a los genes *bla*<sub>CTX-M-9</sub> y *bla*<sub>CTX-M-2</sub> (93, 94).

Existe una relación muy estrecha entre la familia de enzimas CTX-M y diferentes  $\beta$ -lactamasas cromosómicas de *Kluyvera* spp., y se ha demostrado que la movilización de estos genes cromosómicos a plásmidos estuvo ligada a la presencia de secuencias de inserción como la *ISEcp1* o *ISCRI* (95, 96).

Con respecto a los transposones, se puede destacar que los de clase II son los más prevalentes en enterobacterias y, dentro de estos, se encuentran los derivados de Tn3 y de Tn21. Los derivados de Tn3 están asociados a la captura, expresión y diseminación de las enzimas tipo TEM e incluyen Tn3 y Tn2 (TEM-1) y Tn801 (TEM-2) (77).

Los integrones de clase 1 están diseminados ampliamente entre las especies de la familia Enterobacteriaceae portando frecuentemente genes que codifican resistencia a  $\beta$ -lactámicos (29). Los genes BLEE se presentan localizados frecuentemente en integrones asociados a *ISCR1*, como en el caso de *bla*<sub>CTX-M-2</sub> ampliamente diseminado en Sudamérica (97) y también en *bla*<sub>CTX-M-9</sub> (94).

#### 1.6.5. Epidemiología de enterobacterias productoras de BLEE

La epidemiología de las BLEE ha evolucionado, experimentando un dramático cambio a nivel mundial desde sus comienzos en los cuales predominaban las BLEE de tipo TEM y SHV a las de tipo CTX-M predominantes en la actualidad (98, 99). Desde principios de siglo, concretamente en Europa se ha producido este cambio en la prevalencia, siendo particularmente dominante la CTX-M-15. En algunos países las comunicaciones de aislamientos que producen enzimas de tipo CTX-M permanecen esporádicos, mientras que en Asia, gran parte de Europa y América del Sur, se ha alcanzado una prevalencia endémica. En los EEUU, aunque la aparición ha sido más tardía, ya se ha podido observar en un estudio del año 2007 la aparición de los genotipos predominantes globalmente, CTX-M-15 y -14. Más recientemente, datos obtenidos a partir de un estudio global de monitorización de tendencias de resistencia (SMART), mostraron en la región Asia-Pacífico y en Latinoamérica, unos porcentajes del 40 % y 30 % de *E. coli* y *Klebsiella* spp. respectivamente, como productores de BLEE, obtenidos a partir de pacientes con infecciones intraabdominales (99). En general, la prevalencia de BLEE en Europa es mayor que en Estados Unidos pero menor que en Asia y Sudamérica, aunque se encuentran amplias diferencias en los distintos países europeos (62). Parece que algunos microorganismos que expresan ciertas enzimas están mejor adaptados a algunas áreas geográficas. Y, si bien el Reino Unido sigue siendo el país europeo con una mayor prevalencia de aislados BLEE, es destacable que países del norte y el este de Europa, Suecia, Noruega y Alemania, que tradicionalmente contaban con tasas inferiores al resto de países europeos, ya se están igualando (62).

Por otra parte, las BLEE de tipo TEM y SHV estaban mayoritariamente asociadas con brotes nosocomiales, principalmente afectaban a pacientes ingresados en UCI (unidad de cuidados intensivos) y era muy raro que aparecieran asociadas con infecciones adquiridas en la comunidad. Además, la prevalencia era más alta entre aislamientos de *K. pneumoniae* que entre aislamientos de *E. coli*. Los factores de riesgo incluían la estancia en UCI, cirugía

reciente, utilización de catéteres, tiempos prolongados de hospitalización y uso previo de cefalosporinas y/o aminoglucósidos (62, 100). En los últimos años, la gran mayoría de los aislados productores de BLEE son cepas de *E. coli* con CTX-M que proceden de pacientes de la comunidad y principalmente causantes de infecciones del tracto urinario con factores de riesgo asociados, como el uso previo de fluorquinolonas y la presencia de infecciones asociadas a cuidados sanitarios (101, 102).

Aunque en menor proporción, también se han descrito BLEE en otros géneros de la familia Enterobacteriaceae diferentes a *E. coli* y *Klebsiella* spp. Hay estudios que informan de una prevalencia en Europa de *Enterobacter*, *Citrobacter* y *Proteus* por debajo del 4 % (103).

En el género *Enterobacter* cabe destacar la existencia de una  $\beta$ -lactamasa cromosómica inducible de clase C que puede conferir resistencia constitutiva a las oximiinocefalosporinas si son hiperproducidas como consecuencia de una desrepresión mutacional (104). Este hecho puede hacer que la detección de las BLEE en el laboratorio no se logre en todos los casos, conduciendo a una falsa baja detección de estas enzimas (105).

Se han descrito a lo largo del mundo numerosos brotes causados en su mayoría por cepas de *K. pneumoniae* y *E. coli* (67, 106-112). Sin embargo, la epidemiología de otras enterobacterias es bastante desconocida debido a los pocos brotes descritos en la literatura.

Concretamente, los brotes producidos por *E. cloacae* productor de BLEE a nivel mundial son muy escasos (113-116). Uno de ellos ha sido descrito en España, concretamente en Barcelona, entre Julio y Septiembre de 2005, y en él se vieron implicados siete pacientes ingresados en una UCI (117).

## **2. OBJETIVOS**



## 2. OBJETIVOS

Los objetivos generales del presente trabajo fueron profundizar en el estudio de los elementos genéticos, implicados en la diseminación de los mecanismos de resistencia a antibióticos, entre enterobacterias productoras de BLEE en el ámbito hospitalario, estudiar las características epidemiológicas y moleculares de un brote hospitalario causado por *E. cloacae*, así como investigar el efecto que puede generar la presencia de las  $\beta$ -lactamasas en la fisiología bacteriana y su impacto en la epidemiología de las mismas.

Se designaron los siguientes objetivos específicos para cada capítulo de este trabajo:

### 2.1. Objetivos capítulo I:

2.1.1. Estudiar la transmisión horizontal *in vivo* de una BLEE entre diferentes aislados de enterobacterias (dos *E. coli* y un *P. mirabilis*) obtenidos de diferentes muestras de una paciente que sufría infecciones del tracto urinario de repetición.

2.1.2. Caracterizar la BLEE implicada en este evento, así como describir su entorno genético y su impacto en la expresión de la BLEE.

### 2.2. Objetivos capítulo II:

2.2.1. Analizar las bases moleculares de la resistencia a antibióticos en un aislado de *E. cloacae* epidémico en el hospital.

2.2.2. Estudiar la epidemiología clínica y molecular de *E. cloacae* productor de BLEE, incluyendo el análisis de los factores de riesgo para la adquisición de la cepa epidémica.

### 2.3. Objetivos capítulo III:

2.3.1. Determinar la interacción entre las diferentes clases de  $\beta$ -lactamasas con la composición y organización del peptidoglicano (PG) en un modelo de *E. coli*.

2.3.2. Analizar la influencia de la expresión de distintas  $\beta$ -lactamasas (pertenecientes a los cuatro grupos moleculares distintos) sobre la fitness bacteriana (*in vitro* e *in vivo*) y la formación de biofilm.



### **3. CAPÍTULO**



### 3. CAPÍTULOS:

#### 3.1. Capítulo I: Diseminación interespecie de la BLEE CTX-M-32 y el papel de la secuencia de inserción IS1 en la reducción de la expresión del gen *bla*<sub>CTX-M-32</sub>

La producción de enzimas  $\beta$ -lactamasas es la causa predominante de resistencia a los antibióticos  $\beta$ -lactámicos en bacterias Gram-negativas. El análisis del entorno genético de las BLEEs podría ayudar a explicar su diseminación, ya que diferentes elementos, tales como las secuencias de inserción, podrían estar involucrados en su movilización y expresión.

En el Hospital Universitario A Coruña, en el año 2004, se describió un nuevo gen de codificación plasmídica, el gen *bla*<sub>CTX-M-32</sub> en un aislado clínico de *E. coli* (118). Este gen, al igual que otros como *bla*<sub>CTX-M-15</sub>, *bla*<sub>CTX-M-16</sub>, *bla*<sub>CTX-M-19</sub> y *bla*<sub>CTX-M-27</sub>, codifica una BLEE que tiene la habilidad de hidrolizar ceftazidima, característica inusual en las  $\beta$ -lactamasas de tipo CTX-M. Las cepas de *E. coli* que portan este gen suelen ser resistentes a ceftazidima, característica que en la CTX-M-32, se debe a la sustitución de un ácido aspártico situado en la posición 240 por una glicina.

En el presente capítulo se describe la transmisión intra e interespecie del gen *bla*<sub>CTX-M-32</sub> así como su entorno genético. También se describe el papel de una secuencia de inserción específica en la regulación de la expresión del gen *bla*<sub>CTX-M-32</sub> y, como consecuencia de ello, su papel en la alteración de la CMI (concentración mínima inhibitoria) a distintos antibióticos  $\beta$ -lactámicos, incluyendo la ceftazidima.

En el estudio se incluyeron dos aislados clínicos diferentes de *E. coli* y un aislamiento de *P. mirabilis* del mismo paciente ingresado en diferentes ocasiones en el Hospital Universitario A Coruña. El primer aislamiento de *E. coli* productor de BLEE (EC1) fue recuperado a partir de una muestra de orina de este paciente que padecía una infección del tracto urinario (ITU) y que había sido previamente tratado con amoxicilina y ácido clavulánico. Dos meses más tarde, durante un nuevo episodio de ITU, se aisló una cepa de *P. mirabilis* productora de BLEE (PM1). Al mismo tiempo, también se aisló la segunda cepa de *E. coli* productora de BLEE (EC2) a partir de un frotis de piel.

Los perfiles de sensibilidad de los aislamientos EC1, EC2 y PM1 y sus transconjugantes mostraron resistencia a la mayoría de los antibióticos  $\beta$ -lactámicos, exceptuando las combinaciones de  $\beta$ -lactámico con un inhibidor de  $\beta$ -lactamasas y el imipenem. La CMI a cefotaxima era mayor que a ceftazidima, dato que sugería la presencia de una enzima de tipo CTX-M.

La transferencia de la resistencia a antibióticos por conjugación se llevó a cabo con la cepa receptora *E. coli* XL1-Blue. La obtención de transconjugantes demostró que la resistencia estaba codificada en plásmidos.

Mediante PCR con oligonucleótidos específicos de enzimas de tipo CTX-M del grupo 1 se detectó un gen BLEE en las cepas clínicas y en sus transconjugantes correspondientes y la secuenciación de los amplicones obtenidos reveló la presencia del gen *bla*<sub>CTX-M-32</sub> en todos los casos. Mediante isoelectroenfoque se demostró que las 3 cepas clínicas y sus transconjugantes tenían una única banda correspondiente a una  $\beta$ -lactamasa con un punto isoelectrónico (pI) de 9 que era el correspondiente a la enzima CTX-M-32.

Para estudiar la relación clonal entre los aislamientos de *E. coli*, EC1 y EC2 se llevó a cabo una PCR de secuencias palindrómicas repetidas extragénicas, se trata de una PCR con cebadores que hibridan con secuencias de ADN repetidas (rep-PCR). Mediante esta técnica se obtuvieron patrones de bandas diferentes, lo que sugería que no existía relación clonal entre ellos. Por otra parte se evaluó si los plásmidos que portaban las diferentes cepas estaban genéticamente relacionados mediante el análisis del polimorfismo de los fragmentos de restricción (RFLP), que consiste en la digestión de los plásmidos con varias enzimas de restricción de manera independiente. Se utilizaron las enzimas *Hind*III, *Hinc*II, *Bam*HI y *Acc*I, obteniéndose patrones de restricción muy similares a partir de los tres plásmidos de los transconjugantes TEC1, TEC2 y TPM1. Con estos resultados se pudo concluir que los plásmidos presentes en los diferentes aislados de Enterobacteriaceae recuperados a partir del mismo paciente eran en realidad el mismo.

Se secuenció el entorno genético del gen *bla*<sub>CTX-M-32</sub> para detectar la presencia de estructuras genéticas potencialmente capaces de movilizarlo. Para ello se realizó la clonación del gen BLEE mediante la digestión del plásmido con *Acc*I y su posterior ligación en el vector de clonación pBGS18, transformando *E. coli* TG1 con la construcción resultante. Las células transformantes obtenidas portaban un plásmido (pAF-1-A) con un inserto de aproximadamente 9 Kpb que fue secuenciado parcialmente. Vale la pena destacar algunas características de esta secuencia, por ejemplo que la secuencia invertida repetida derecha (IRR) de *ISEcp1B* se detectó 80 pb antes del codón de comienzo ATG del gen *bla*<sub>CTX-M-32</sub>, tal como se había descrito previamente (118), pero a diferencia de lo anteriormente descrito, en este fragmento las secuencias promotoras (-35) y (-10) se encontraban separadas físicamente y, por lo tanto, modificadas por la presencia de la secuencia de inserción *IS1*. La *IS1* estaba rodeada por una secuencia de 5 pb duplicada, probablemente, como resultado de un proceso de transposición y contenía, además, dos secuencias imperfectas de 18 pb invertidas

repetidas (con sólo 4 diferencias nucleotídicas presentes), la secuencia repetida izquierda (IRL) y la secuencia repetida derecha (IRR) rodeando a una proteína InsA-InsB que codificaba una transposasa y cuya integridad se sugiere que es esencial para el evento de transposición (119, 120).

Para comprobar la funcionalidad del promotor del gen *bla*<sub>CTX-M-32</sub> y el papel de la inserción de *IS1* en la separación de las regiones (-35) y (-10) y como consecuencia de ello en la expresión del gen *bla*, se realizaron un conjunto de experimentos. A partir del plásmido pAF-1-A se obtuvo el plásmido pAF-3-A, que contenía los promotores y la secuencia *IS1* interrumpiendo los mismos. Por otro lado se obtuvo el plásmido pAF-2-A, a partir del pMC-2 previamente descrito, que contenía los promotores intactos después de la secuencia de inserción *IS5* y antes del gen *bla*<sub>CTX-M-32</sub> (118).

Se determinaron las CMIs a diferentes antibióticos, destacando el resultado a ceftazidima para los transformantes de *E. coli* TG1 portadores de pAF-2-A y pAF-3-A que resultaron ser de >256 y 4 mg/L, respectivamente.

Por otra parte la actividad específica a nitrocefín obtenida a partir de las cepas de *E. coli* que contenían los plásmidos transformantes pAF-2-A y pAF-3-A (con el promotor intacto y alterado, respectivamente) fue de  $1,9 \pm 0,05 \times 10^{-4}$  y de  $8,9 \pm 2,2 \times 10^{-6}$   $\mu\text{moles s}^{-1}$  por  $\mu\text{g}^{-1}$  de proteína de extracto celular, respectivamente.

Además, se realizó un análisis mediante RT-PCR que corroboró estos datos mostrando una expresión 10 veces mayor de la *bla*<sub>CTX-M-32</sub> con su promotor intacto, a partir del plásmido pAF-2-A, con respecto al plásmido pAF-3-A, en el que la secuencia de inserción *IS1* se encontraba modificando la región promotora.

Todos estos datos apoyan la hipótesis de que la inserción de la *IS1* provoca una disminución de la expresión de *bla*<sub>CTX-M-32</sub>.

En resumen, se describe la transmisión horizontal *in vivo* de un plásmido que codifica una BLEE, la CTX-M-32, entre dos aislamientos diferentes de *E. coli* y uno de *P. mirabilis*. Además se describe el entorno genético hallándose una secuencia de inserción, *IS1*, que funciona como regulador negativo de la expresión de la BLEE.

(Ver publicación en anexo I)

### **3.2. Capítulo II: Aparición en España de un aislamiento clínico de *Enterobacter cloacae* multirresistente productor de la BLEE SFO-1**

A lo largo del mundo, se han descrito brotes importantes producidos por cepas de *K. pneumoniae* y *E. coli* productores de BLEE (106-112). Sin embargo existen escasas publicaciones de brotes producidos por cepas de *E. cloacae* productoras de BLEE (113, 115-117, 121). Hasta la fecha de este estudio sólo se había descrito uno en España, concretamente en Barcelona, entre Julio y Septiembre de 2005 (117), en el que se vieron implicados 7 pacientes ingresados en una UCI.

En 2006, se observó un incremento anormal de aislamientos de *E. cloacae* productor de BLEE en los pacientes del Hospital Universitario A Coruña, que presentaban un patrón de multirresistencia antibiótica, siendo sólo sensibles a los antibióticos carbapenémicos. Este hecho promovió la necesidad de realizar el presente estudio con el objetivo de analizar las bases moleculares de la resistencia a antibióticos así como la epidemiología clínica y molecular de los *E. cloacae* productores de BLEE, considerando los factores de riesgo para la adquisición de la cepa epidémica y realizando un análisis de las características clínicas y epidemiológicas de los pacientes afectados.

Durante el período de estudio, entre Febrero de 2006 y Octubre de 2009, una cepa epidémica de *E. cloacae* infectó y/o colonizó a 38 pacientes. Se desarrolló una infección en 26 pacientes (68.4 %), siendo la del tracto urinario la más frecuente (54 %). En el momento del aislamiento, 17 pacientes se encontraban ingresados en una UCI, 12 en unidades de ingreso médicas y 8 en unidades quirúrgicas. Sólo había un paciente externo cuya infección fue considerada nosocomial debido a que había estado ingresado en los 9 días previos al aislamiento. Por lo tanto, cabe destacar, que en todos los casos la cepa fue considerada de adquisición nosocomial.

Con respecto a las muestras clínicas de las cuales fueron recuperados los aislamientos, se trataba principalmente de muestras de orina (19 de 38) y menos frecuentemente de otras, presentando algunos pacientes más de una muestra positiva.

La mortalidad total fue del 26 % (10 pacientes), pero no fue posible relacionarla directamente con la infección/colonización de la cepa epidémica o bien este hecho no había quedado reflejado en la historia clínica.

Los aislamientos presentaban altos niveles de resistencia, siguiendo criterios del CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute), a diferentes familias de antibióticos, a

los antibióticos  $\beta$ -lactámicos con excepción de los carbapenémicos, a las quinolonas, a los aminoglucósidos y al cotrimoxazol. La interpretación para la tigeciclina con una CMI de 2, en ausencia de puntos de corte por CLSI, se realizó en base a las guías de EUCAST (European Committee on Antimicrobial susceptibility testing), y la cepa epidémica (la cual fue denominada como EbSF) fue clasificada como resistente a tigeciclina. Estos resultados ponen de manifiesto el carácter multirresistente de los aislamientos, que mostraron un patrón de sensibilidad a antibióticos muy similar. La detección de BLEE en estos aislamientos se realizó mediante la determinación de la CMI a cefepime en presencia o ausencia de ácido clavulánico (Etest) revelándose una disminución de la CMI mayor de 3 diluciones en presencia de ácido clavulánico (de una CMI de más de 16  $\mu\text{g/ml}$  a cefepime a 0,125  $\mu\text{g/ml}$  a cefepime más ácido clavulánico).

Para estudiar la relación clonal de los aislamientos implicados en el brote se llevaron a cabo dos técnicas, la electroforesis en campo pulsado (PFGE) y una técnica semiautomatizada basada en la rep-PCR. Para la realización del PFGE, el ADN genómico de *E. cloacae* fue digerido con la enzima de restricción *XbaI* de acuerdo con los procedimientos descritos (122) y se procedió a la interpretación de los resultados según los criterios de Tenover y colaboradores (123). La técnica de rep-PCR se realizó con el sistema DiversiLab® siguiendo las instrucciones del fabricante (bioMérieux, France) (124).

El análisis mediante rep-PCR se llevó a cabo en 36 aislamientos, utilizando como punto de corte un coeficiente de similitud mayor al 95 %. El resultado obtenido concluía que se trataba de aislamientos genéticamente relacionados. Por otra parte, 25 de estas cepas fueron también estudiadas por PFGE, obteniéndose idénticos resultados. Sólo los aislamientos de *E. cloacae* genotípicamente no relacionados (ATCC 13874 y dos aislamientos clínicos no relacionados de *E. cloacae*), utilizados como controles, resultaron diferentes presentando un coeficiente de similitud menor del 95%. Cabe destacar que la técnica de rep-PCR había sido utilizada anteriormente como método de tipación en un estudio epidemiológico de *E. cloacae*, en el contexto de un brote detectado en el noroeste de España (124).

Todos los aislados clínicos producían dos  $\beta$ -lactamasas con puntos isoeléctricos de 5,4 y 7,3, que fueron identificadas por procedimientos de clonación y secuenciación, como TEM-1 y SFO-1, respectivamente.

El análisis de los resultados genotípicos y fenotípicos sugería que los 36 aislamientos de *E. cloacae* estudiados habían surgido a partir del mismo clon, confirmando una expansión

clonal. Este dato nos permitió continuar el estudio con una sola cepa (proveniente del caso número 8) a la que se nombró EbSF.

EbSF albergaba un plásmido con un tamaño aproximado de 60 Kpb (pAF-1-B), que se utilizó para transformar *E. coli* TG1, obteniéndose el transformante TG1-pAF-1-B, que conservaba el fenotipo BLEE.

Se procedió a la clonación del gen BLEE, siguiendo protocolos anteriormente descritos (125), utilizándose para ello el plásmido pAF-1-B y obteniendo el plásmido pAF-2-B que presentaba fenotipo BLEE, con un inserto de aproximadamente 24 Kpb. Finalmente, un fragmento de 10 Kpb fue secuenciado, identificándose el gen SFO-1 (también llamado ampA) (126). La secuenciación también reveló la presencia del gen *ampR* upstream de *bla*<sub>SFO-1</sub>. El entorno genético del gen *bla* fue secuenciado y se encontraron dos secuencias de IS26 rodeando el gen *ampR-ampA*, con sus secuencias invertidas repetidas completas, derecha (IRR) e izquierda (IRL).

Las IR se encuentran situadas a la derecha e izquierda de algunos genes y pueden ser las dianas de eventos de transposición. El segmento completo flanqueado por dos copias de IS26, podría ser considerado un verdadero transposón compuesto. La secuenciación adicional reveló la presencia de una transposasa *tniA* situada upstream del gen 5'IS26 junto con genes implicados en la resistencia al mercurio (*merA*, *merD* y *urf2*). También se encontró un gen que codificaba una aminoglicósido acetiltransferasa (*aac3*) downstream de la 3'IS26. Se demostró la presencia del gen *bla*<sub>SFO-1</sub> y se describió su entorno genético en los 38 aislamientos de *E. cloacae* mediante ensayos de PCR.

Por otro lado, se determinaron los factores de riesgo asociados con la infección o colonización por EbSF (cepa epidémica de *E. cloacae* productora de BLEE y multirresistente) mediante un estudio de casos y controles. Los datos fueron almacenados y analizados usando el programa informático SPSS versión 15.0. Se compararon 24 casos (pacientes colonizados o infectados entre 2006 y 2007) con 80 pacientes control en un estudio retrospectivo. La comparación entre los casos y controles se realizó mediante un análisis univariado para poder determinar las variables significativamente asociadas con la colonización/infección por EbSF. Las diferencias de las variables cuantitativas fueron comparadas usando la *t* de Student y las variables cualitativas fueron analizadas por el test de Fisher o el chi-cuadrado. El análisis multivariante incluyó todas las variables con  $p < 0,1$  obtenidas en el análisis univariante. Los resultados con una  $p < 0,05$  fueron considerados estadísticamente significativos. Mediante la comparación de las características demográficas



y la comorbilidad se demostró que no había diferencias significativas en estos parámetros entre los casos y controles. Los factores que se encontraron asociados a infección/colonización producida por la cepa epidémica, mediante el análisis univariante, fueron los siguientes: insuficiencia renal crónica, la presencia de catéter venoso central, sondaje vesical, hospitalización previa, y la traqueostomía.

La administración previa de  $\beta$ -lactámicos y quinolonas fue también más frecuente en el grupo de los infectados/colonizados.

El análisis multivariante mostró que los factores asociados de forma independiente a la infección o a la colonización por EbSF fueron: insuficiencia renal crónica (odds ratio [OR] = 4,85, Intervalo de confianza (IC) 95 %, 1,46 a 16,08), traqueostomía (OR 7,67, IC 95 %, 1,10 a 53,39), y hospitalización previa (OR = 3,90, IC 95 %: 1,03 a 14,75). Con respecto a los antibióticos, la administración previa de un antibiótico  $\beta$ -lactámico (ampicilina, cloxacilina, amoxicilina-ácido clavulánico, y piperacilina) resultó ser un factor significativo (OR 4,24, IC 95 %, 1,29 a 13,90) en la colonización/infección por esta cepa.

En resumen, se describe el primer brote producido por un aislamiento de *E. cloacae* productor de la inusual BLEE SFO-1, destacando el carácter nosocomial de la cepa epidémica y su perfil de multirresistencia. Además cabe destacar que SFO-1 sólo había sido aislada previamente como un caso aislado en Japón.

(Ver publicación en anexo II)

### **3.3. Capítulo III: La expresión de las $\beta$ -lactamasas de tipo OXA y la SFO-1 provoca cambios en la composición del peptidoglicano y afecta a la *fitness* bacteriana**

La resistencia a los antibióticos es actualmente uno de los principales problemas en el campo de la salud pública. El mecanismo más común de resistencia a los antibióticos  $\beta$ -lactámicos es la producción de  $\beta$ -lactamasas, enzimas que los degradan, las cuales exhiben gran diversidad, tanto en estructura como en función. La clasificación molecular descrita por Ambler es la más sencilla. Se basa en la secuencia de la proteína dividiendo a las  $\beta$ -lactamasas en cuatro clases (A-D) (44).

Las dianas de actuación de los antibióticos  $\beta$ -lactámicos son las PBPs que están implicadas en la síntesis y el procesamiento de PG (11). El PG forma una red elástica en la

pared celular cuyas principales funciones son resistir a la presión intracelular, evitando que se produzca una lisis osmótica, y mantener una forma celular definida (8).

Se ha hipotetizado que las  $\beta$ -lactamasas y las PBPs evolucionaron a partir de un ancestro común, la PBP primordial, mediante procesos independientes y quizás en paralelo (46), y que cada una se especializó posteriormente en diferentes funciones. Las PBPs pueden exhibir diferentes actividades, pudiendo trabajar como transpeptidasas, carboxipeptidasas ó endopeptidasas (11) y las  $\beta$ -lactamasas tienen la capacidad de inactivar antibióticos  $\beta$ -lactámicos por hidrólisis del anillo  $\beta$ -lactámico. Sin embargo, se ha descrito que una PBP, la PBP5 de *Pseudomonas*, presenta una débil actividad hidrolítica similar a la de las  $\beta$ -lactamasas (48). También se ha sugerido que la  $\beta$ -lactamasa AmpC muestra una actividad residual *in vivo* DD-carboxipeptidasa, describiéndose un efecto sobre la tasa de crecimiento cuando se expresa en *Salmonella* (127).

El estudio de la *fitness* en bacterias que expresan diferentes  $\beta$ -lactamasas proporciona un método sensible para detectar diferencias fenotípicas (128), ya que se ha descrito previamente que la adquisición de plásmidos con genes de resistencia a los antibióticos puede tener diferentes efectos sobre la *fitness* bacteriana (129, 130). Los objetivos del presente capítulo fueron determinar la interacción entre las diferentes clases de  $\beta$ -lactamasas con la composición y estructura del PG y analizar la influencia de la presencia de estas  $\beta$ -lactamasas sobre la *fitness* bacteriana y la formación de *biofilm*.

Para llevar a cabo este trabajo, en primer lugar se construyeron clones bacterianos isogénicos que expresaban las siguientes  $\beta$ -lactamasas pertenecientes a las distintas clases moleculares: TEM-1, TEM-29, CTX-M-32, CTX-M-8, CTX-M-2, CTX-M-14, SFO-1 (con y sin la presencia del regulador AmpR) correspondientes a la clase A, VIM-1 perteneciente a la clase B, FOX-4 de la clase C, OXA-24 y un derivado de OXA-10 (OXA-10-like) correspondientes a la clase D. Todas fueron clonadas en los sitios de restricción *Bam*HI y *Eco*RI en el vector pBGS18-pCT (pB) que contenía un promotor entero del gen CTX-M-14, y un gen de resistencia a la kanamicina. Las construcciones plasmídicas se emplearon para transformar células de *E. coli* MG1655 competentes (MG) obteniéndose así clones portadores que expresaban las diferentes  $\beta$ -lactamasas.

Como control negativo se empleó *E. coli* MG portador del vector pB, que no expresaba ninguna  $\beta$ -lactamasa.

La adecuada expresión de todas las  $\beta$ -lactamasas se comprobó mediante la determinación de las CMI's a antibióticos específicos, que dependen del perfil hidrolítico de cada  $\beta$ -lactamasa. Todos los clones mostraron un perfil de sensibilidad antibiótica adecuado acorde con los datos publicados anteriormente, lo que demostró la correcta expresión de todas las  $\beta$ -lactamasas.

Se realizó el estudio de la composición del PG de los aislamientos de *E. coli* que producían las distintas  $\beta$ -lactamasas siguiendo el protocolo descrito previamente (98). El PG se purificó a partir de un cultivo bacteriano realizado en LB con una densidad óptica de 1 medido a una longitud de onda de 600 nm. Además añadimos imipenem, a una concentración subinhibitoria de 0,06  $\mu$ g/ml al comienzo del cultivo.

A continuación se analizó el efecto que la producción de las  $\beta$ -lactamasas tenía sobre la composición del PG. Cabe destacar que la distribución de la longitud de las cadenas de glicano en *E. coli* es extremadamente amplia y depende de la cepa, las condiciones y la fase de crecimiento (8). A pesar de esta variabilidad, en el presente estudio fue posible realizar comparaciones en la composición de PG debido a que las  $\beta$ -lactamasas estaban clonadas en el mismo vector y la extracción y el análisis del PG fueron realizados bajo condiciones experimentales idénticas y en tres réplicas biológicas independientes.

No se observaron grandes diferencias cualitativas entre los componentes del PG de las cepas estudiadas. Sin embargo, sí que se encontraron cambios cuantitativos en las cepas portadoras de pB-OXA-10-like, pB-OXA-24, y pB-AmpR-SFO-1, mostrando una disminución en los niveles de dímeros y trímeros, muropéptidos anhidros, y pentapéptidos y un aumento de monómeros y muropéptidos unidos a lipoproteína. La composición de muropéptidos del PG en las cepas restantes era casi idéntica a la del control (MG-pB).

Para intentar visualizar estos cambios observados en la pared celular se realizó microscopía electrónica de transmisión (TEM). Esta técnica ha sido utilizada previamente para investigar los efectos de los antibióticos sobre la pared celular, observándose cambios morfológicos y estructurales (131). El análisis de las imágenes obtenidas por TEM reveló que pese a los cambios cuantitativos de composición en el PG, en las cepas portadoras de los plásmidos recombinantes pB-AmpR-SFO-1, pB-OXA-10-like, pB-OXA24 y pB, no se observaba ningún cambio ultraestructural en la pared celular.

Para evaluar la implicación de la presencia de las  $\beta$ -lactamasas en la *fitness* de *E. coli* se realizaron experimentos de competición, tanto *in vitro* como *in vivo*, así como curvas de

crecimiento. Al analizar las curvas de crecimiento, realizadas en medio rico (LB) y sin antibióticos, se observó que todas presentaban el mismo patrón, con una tasa de crecimiento similar con valores que oscilaban entre 0,021 hasta 0,023 h<sup>-1</sup>.

Los experimentos de competición *in vitro* (*fitness in vitro*) se realizaron en un ambiente libre de antibióticos y el resultado de los mismos era dependiente de su *fitness* relativa. La *fitness* relativa se define como la eficacia de multiplicación de la cepa resistente (MG con las diferentes  $\beta$ -lactamasas), en comparación con la susceptible (MG-pB), y la medida se realiza mediante el cálculo del índice de competición (CI). Este parámetro se define como el cociente entre el número de colonias recuperadas de la cepa que porta el plásmido pBGS18 con una  $\beta$ -lactamasa y de la cepa con el plásmido pBGS18 sin la presencia de ninguna  $\beta$ -lactamasa.

La presencia de plásmidos que codifican los genes de  $\beta$ -lactamasas *bla*<sub>CTX-M-32</sub>, *bla*<sub>CTX-M-8</sub>, *bla*<sub>TEM-1</sub>, *bla*<sub>VIM-1</sub>, *bla*<sub>FOX-4</sub>, y *bla*<sub>SFO-1</sub> (sin la presencia de AmpR) no se asoció con un coste de *fitness* significativo *in vitro*. Sin embargo, se observó una disminución marcada y estadísticamente significativa en el índice de competición de MG que portaba los plásmidos recombinantes pB-AmpR-SFO-1, pB-OXA-10-like, y pB-OXA-24 ( $p < 0,05$  en todos los casos).

El mayor descenso se observó para la competición MG-pBOXA-10-like / MG-pB, con un CI medio de 0,3, seguido por las competiciones MG-pB-OXA-24 / MG-pB y MG-pB-AmpRSFO-1 / MG-pB, con medias de CI de 0,43 y 0,55, respectivamente.

Cabe destacar que aquellas  $\beta$ -lactamasas que mostraron cambios en la composición cuantitativa del PG estaban clara y directamente relacionadas con una reducción de la *fitness* en los experimentos *in vitro*.

Se realizó también un modelo murino de infección sistémica para obtener una valoración *in vivo* de la *fitness*, ya que los datos obtenidos en un modelo animal nos acercan a lo que se produciría en el sitio de la infección dentro del cuerpo humano. Los resultados obtenidos fueron similares a los obtenidos *in vitro*. MG-pB-OXA-10-like y MG-pB-AmpRSFO-1 se asociaron con un incremento significativo ( $p < 0,001$ ) del coste biológico, y MG-pBTEM-1 y MG-pB-SFO-1 no mostraron ningún efecto, ya que los resultados de *fitness* fueron iguales al control MG (pB).

Por último se realizaron ensayos de biofilm para evaluar si los cambios observados en el PG tenían efectos sobre su formación. Como resultado, se obtuvo que las cepas

estudiadas (MGpB, MG-pBTEM-1, MG-pBAmpR-SFO-1, MG-pBSFO1, MG-pBOXA-10-*like* y MG-pBOXA-24) formaban menor cantidad de biofilm que la cepa control MG-pB.

En resumen, se observaron cambios cuantitativos en la composición del PG en las cepas de *E. coli* expresando las siguientes  $\beta$ -lactamasas: la OXA-24, un derivado de OXA-10 y la SFO-1 precedida por el gen AmpR. Además estos cambios se asociaron con una significativa disminución de la *fitness* tanto en un modelo *in vivo* como *in vitro*.

(Ver publicación en anexo III)



## **4. DISCUSIÓN**





## 4. DISCUSIÓN

### 4.1. Discusión Capítulo I

El seguimiento de los casos de pacientes con infecciones producidas por microorganismos portadores de BLEE es muy importante debido a su gran significado clínico. Las BLEE están frecuentemente codificadas en plásmidos que a su vez portan genes de resistencia de otras clases ó familias de antibióticos siendo, por lo tanto, las opciones de tratamiento de los microorganismos productores de BLEE, muchas veces extremadamente limitadas (49).

A partir de diferentes muestras de orina de una paciente ingresada en nuestro hospital, fueron aisladas varias enterobacterias productoras de BLEE, concretamente dos cepas genéticamente no relacionadas de *E. coli* y una cepa de *P. mirabilis*, siendo todas ellas productoras de la misma BLEE, la CTX-M-32. La paciente presentaba una historia de ITUs recurrentes y presencia de cálculos renales, lo cual podría haber favorecido la transmisión del plásmido que portaba el gen *bla*<sub>CTX-M-32</sub>, ya que se ha descrito anteriormente el papel en la formación de los cálculos renales de las bacterias ureolíticas, como el *P. mirabilis*. La actividad ureasa de estas bacterias crea una orina alcalina, que causa la precipitación de cristales de estruvito y apatita (132, 133). Además, la producción de biofilm puede facilitar la supervivencia bacteriana e incrementar su virulencia, así como facilitar la transferencia de genes de forma horizontal (134).

Hay pocos ejemplos descritos en la literatura que muestren transmisión *in vivo* entre microorganismos de genes BLEE. Mugnaioli y *col* (135) describieron una transmisión *in vivo* del gen *bla*<sub>CTX-M-1</sub> entre *E. coli* y *Citrobacter amalonaticus* y *Morganella morganii*, lo cual subraya la habilidad de expansión entre diferentes especies de enterobacterias de los genes BLEE de tipo CTX-M.

El análisis de la secuencia que rodea al gen *bla*<sub>CTX-M-32</sub> en las cepas clínicas reveló la presencia de diferentes IS. La primera estaba parcialmente interrumpida por un fragmento del gen de la transposasa *tnpA* de *ISEcp1*. La siguiente IS que se encontró fue la IS5 completa, la cual había sido anteriormente descrita en la región *upstream* de *bla*<sub>CTX-M-32</sub> (118). La secuencia de inserción IS1 fue encontrada entre la IS5 y *bla*<sub>CTX-M-32</sub> con su secuencia completa, con todos los elementos requeridos para su función. La secuencia de inserción IS1 ha sido también detectada en anteriores ocasiones en la región *upstream* de

genes *bla*<sub>CTX-M</sub> e interrumpiendo la secuencia de inserción *ISEcp1* (136). Las secuencias de inserción, del tipo de la *IS1*, son una importante fuente de plasticidad genética en procariotas (119, 120, 137). En el presente trabajo se muestra la primera descripción de la presencia de las secuencias de inserción *ISEcp1* (truncada), *IS5* e *IS1* juntas en el mismo plásmido, en la región *upstream* de un gen *bla*<sub>CTX-M</sub>. Además se detectó una secuencia de 281 pb en la región *downstream* del gen *bla*<sub>CTX-M-32</sub>. Esta región correspondía a una parte truncada de la ORF-477, que había sido encontrada previamente en estructuras genéticas que rodeaban a los genes plasmídicos *bla*<sub>CTX-M</sub> en aislamientos clínicos y también había sido descrita en la región *downstream* del gen *bla*<sub>CTX-M-3</sub> de *Kluyvera ascorbata* (52, 136).

Las CMIs a ceftazidima para los transconjugantes y transformantes que portaban el plásmido con el gen *bla*<sub>CTX-M-32</sub>, no fueron tan altas como se esperaba para la enzima CTX-M-32, tal y como había sido descrito previamente por nuestro grupo, que se caracteriza por su alta hidrólisis a este antibiótico (118). Un detallado análisis de la secuencia localizada en la región *upstream* del gen *bla*<sub>CTX-M-32</sub>, demostró que la secuencia de inserción *IS1* estaba localizada entre las cajas promotoras (-35) y (-10), rompiendo de este modo la funcionalidad de la región promotora del gen *bla*<sub>CTX-M-32</sub>. El análisis de los datos de RT-PCR demostró que la expresión del gen *bla*<sub>CTX-M-32</sub> con su promotor intacto (plásmido pAF-2-A) era 10 veces superior con respecto al que presentaba la *IS1* modificando la región promotora (plásmido pAF-3-A). Además, el cociente de la actividad específica relativa a nitrocefina de los extractos de proteína de los transformantes pAF-2-A y pAF-3-A resultó ser 20 veces mayor para pAF-2-A. Con estos datos, se puede inferir que la inserción en la región promotora de la *IS1* puede ser el motivo por el que existen las diferencias en la expresión de la  $\beta$ -lactamasa y, por lo tanto, en las CMIs a ceftazidima y a otros  $\beta$ -lactámicos de amplio espectro. Por lo tanto, se concluye que las secuencias de inserción, además de contribuir a la movilización (24) ó a la expresión de alto nivel de los genes BLEE, como por ejemplo en los casos de *bla*<sub>CTX-M-19</sub> (88) y de *bla*<sub>CTX-M-32</sub> (118), también pueden reducir o eliminar la expresión de los genes que codifican  $\beta$ -lactamasas, debido a la interrupción de una región promotora específica, tal y como se describe en este estudio.

En resumen, en el presente trabajo se describe la transmisión de un plásmido, que porta el gen *bla*<sub>CTX-M-32</sub>, entre dos géneros diferentes de enterobacterias en una paciente que sufría infecciones urinarias de repetición. El análisis de la secuencia de ADN que rodea el gen *bla*<sub>CTX-M-32</sub> reveló una nueva estructura compuesta por *ISEcp1*, *IS5* e *IS1*, hallándose esta última en la región promotora del gen *bla*<sub>CTX-M-32</sub>, provocando una reducción en la expresión

de la BLEE. Se describe la capacidad de modulación de la resistencia a antibióticos por parte de una secuencia de inserción, que en este caso provoca la existencia de una CMI a ceftazidima más baja. Además, como consecuencia de ello, la presencia de estas estructuras podría complicar la detección de estas enzimas de tipo CTX-M que típicamente producen hidrólisis de ceftazidima.

## 4.2. Discusión capítulo II

Este estudio es el primero en el que se describe un brote hospitalario producido por la diseminación clonal de un aislamiento de *E. cloacae* portador de la BLEE SFO-1 (EbSF). Se trata también, del primer hallazgo de la BLEE SFO-1 en Europa, ya que esta  $\beta$ -lactamasa había sido descrita anteriormente sólo en Japón en un caso aislado (126).

Las opciones de tratamiento de estos pacientes son extremadamente limitadas. Los fármacos de elección son los antibióticos carbapenémicos (principalmente el imipenem), aunque su uso en exceso es un motivo de creciente preocupación (138). También la tigeciclina ha mostrado una buena actividad contra *Enterobacter* spp. productor de BLEE (139), aunque en este caso no puede ser usada como alternativa al tratamiento con carbapenemes, ya que la cepa EbSF mostraba una CMI a tigeciclina de 2  $\mu$ g/mL que es resistente según los criterios del EUCAST. Con respecto a los métodos de detección del fenotipo BLEE, es importante destacar que en las especies productoras de AmpC cromosómica como *Enterobacter* spp., el Etest cefepime-clavulánico es más sensible que otros métodos usados para *E. coli* y *Klebsiella* spp., debido a que el cefepime es un sustrato pobre para la  $\beta$ -lactamasa AmpC (104). Es muy importante recordar esta característica en la detección del fenotipo BLEE con el fin de alcanzar buenas prácticas en los laboratorios de microbiología clínica. La detección de BLEE en estos aislamientos tiene implicaciones clínicas importantes, ya que influye en las decisiones de una terapia apropiada y también determina las medidas de control de la infección como, por ejemplo, los aislamientos de contacto de los pacientes.

Se llevó a cabo el estudio de la relación clonal mediante las técnicas de rep-PCR y PFGE, y el resultado mostró que todos los aislamientos estaban epidemiológicamente relacionados y probablemente se habían originado desde el mismo clon. Los resultados del PFGE y rep-PCR y el hecho de presentar el mismo patrón antibiótico de multirresistencia para todos los aislamientos de *E. cloacae*, nos proporcionaron las evidencias para demostrar

que se trataba de una expansión epidémica. Además podemos concluir que existe una buena correlación entre las técnicas de PFGE (considerado el *gold standard* para la tipación de bacterias con importancia clínica y la identificación de diferentes clones (140)) y la rep-PCR, la cual había sido previamente demostrada para *E. coli* (141) y otros miembros de la familia Enterobacteriaceae (142), pero no para *E. cloacae*.

Debido a que se trata de la primera descripción de una cepa de *E. cloacae* productora de SFO-1 que causa problemas epidemiológicos, el estudio de los factores de riesgo y la identificación de grupos de pacientes vulnerables constituye una parte importante en el manejo y control de estas infecciones. Por ello, se llevó a cabo un estudio de casos-controles para identificar los factores de riesgo asociados con la adquisición de cepas de *E. cloacae* productoras de BLEE. El análisis multivariante reveló que la administración previa de antibióticos  $\beta$ -lactámicos, la traqueostomía, la hospitalización previa, y el fallo renal crónico estaban estadísticamente relacionados con la adquisición de EbSF. La mayoría de estos factores de riesgo ya han sido descritos previamente en la literatura relacionados con la adquisición de otras enterobacterias productoras de BLEE (143-148). No se ha descrito previamente como factor de riesgo el fallo renal crónico, pero en estos pacientes la patología del tracto urinario se ve probablemente incrementada, por lo que podría, indirectamente, favorecer la infección del tracto urinario o la colonización por EbSF y constituir así un factor de riesgo importante como se describe en este trabajo.

Este estudio aporta datos a la poco conocida epidemiología de las cepas de *E. cloacae* productoras de BLEE. La epidemiología de este clon de *E. cloacae* es muy similar a la que se ha descrito en *K. pneumoniae*, ya que se trata de un microorganismo de carácter nosocomial, ninguno de los casos fue adquirido en la comunidad, y la relación entre los aislamientos era clonal (109).

Como SFO-1 es una  $\beta$ -lactamasa aislada muy raramente resulta de interés la secuenciación de su entorno genético, en la que se encontró que el gen *bla*<sub>SFO-1</sub> estaba flanqueado por la secuencia de inserción IS26 rodeada por los brazos derecho e izquierdo (IRR e IRL), lo que podría permitir al gen de la  $\beta$ -lactamasa expandirse como un elemento autónomo transponible. IS26 está normalmente asociada con genes de resistencia antibiótica y podría estar involucrada en la diseminación por varias rutas, incluyendo la translocación de genes de resistencia localizados en el cromosoma (89, 149).

Cabe destacar que mediante procedimientos de clonación y expresión se demostró que el patrón de resistencia a  $\beta$ -lactámicos de las cepas EbSF estaba codificado por vía

plasmídica, susceptible por lo tanto de ser transmisibles a otras bacterias, sin embargo, a pesar de este hecho y de que se encontraba dentro de un elemento autónomo transponible, no se detectaron en nuestro hospital otras enterobacterias portadoras de este plásmido.

La gran expansión de la cepa EbSF nos lleva a hipotetizar sobre sus formas de transmisión, siendo la explicación más probable que se haya transmitido de persona a persona por contacto directo, siendo los principales portadores las manos del personal sanitario. A lo largo del estudio, la presencia de pacientes colonizados probablemente favoreció la extensión y permanencia epidémica de la cepa. Muchos de los pacientes implicados estaban altamente colonizados y presentaban muestras nasales, rectales y axilares positivas. Las tasas de colonización por aislamientos de *E. cloacae* productor de BLEE están experimentando un crecimiento significativo en los últimos años, como muestra un estudio realizado en Chicago entre el año 2000 y 2005 (150) y esto conlleva un gran peligro debido a que los pacientes colonizados con *E. cloacae* productor de BLEE tienen un riesgo incrementado de desarrollar infección posteriormente por este microorganismo.

La presencia de la cepa EbSF se mantuvo durante un largo período y, debido a que aún aparecen algunos casos, es probable que se haya convertido en endémica en nuestro ámbito hospitalario. Por ello, se concluye que es de gran importancia monitorizar las infecciones/colonizaciones emergentes producidas por *E. cloacae* productor de BLEE en todos los hospitales, procurando identificarlos correctamente en los laboratorios de microbiología clínica y realizando estrictas medidas de control desde el comienzo, para así evitar la endemidad, ya que el control de productores de BLEE endémicos es realmente complicado (121, 151, 152).

Los datos presentados en este trabajo confirman que *E. cloacae* productor de BLEE podría estar aumentando su incidencia como patógeno nosocomial y demuestran el carácter epidémico que estas cepas podrían adquirir. El aumento de la multirresistencia entre patógenos nosocomiales como *E. cloacae* es muy preocupante ya que disminuye la capacidad de tratamiento de estas infecciones en un futuro debido a la limitación de antibióticos eficaces disponibles.

En resumen, se describió por primera vez en Europa una cepa epidémica de *E. cloacae* con perfil multirresistente, sólo susceptible a antibióticos carbapenémicos, que expresa la inusual BLEE SFO-1 en el contexto de un brote hospitalario con un gran número de pacientes implicados.

### 4.3. Discusión capítulo III

Este estudio se realizó con el principal objetivo de observar si la expresión de  $\beta$ -lactamasas de diferente naturaleza se asociaba con el metabolismo del PG, lo cual apoyaría la hipótesis de un origen ancestral común con las PBPs. Otro objetivo, fue clarificar las implicaciones de este hecho en la epidemiología de las  $\beta$ -lactamasas. Ésto se realizó a través del estudio de la *fitness* de *E. coli* expresando diferentes  $\beta$ -lactamasas relacionado con los cambios en la composición del PG. En previas publicaciones se describieron cambios en la composición del PG de *Salmonella* produciendo enzimas de tipo AmpC y su efecto en la virulencia (127), aunque no se realizaron estudios de *fitness* relativa.

La comprensión de las bases fisiológicas del coste en *fitness* en los aislamientos que portan  $\beta$ -lactamasas es relevante clínicamente, ya que los antibióticos  $\beta$ -lactámicos son los más frecuentemente usados en el tratamiento de las enfermedades infecciosas y las  $\beta$ -lactamasas constituyen el principal mecanismo de resistencia a  $\beta$ -lactámicos en bacilos Gram-negativos. Además analizar el comportamiento bacteriano de las cepas que portan estos enzimas sin la presencia de antibióticos es interesante para conocer su capacidad de mantenerse, colonizar, e incluso infectar.

Es difícil evaluar este tema debido a la diversidad de factores que podrían influir en el resultado final. Por este motivo, los experimentos que presentamos en este trabajo fueron realizados en cepas isogénicas bajo condiciones idénticas, con el objeto de que los resultados reflejasen con precisión la relación entre las  $\beta$ -lactamasas estudiadas, la composición del PG de la cepa en la que están presentes estas  $\beta$ -lactamasas y su *fitness*.

El efecto de las  $\beta$ -lactamasas sobre la composición del PG se observó cuando se añadieron concentraciones subinhibitorias de imipenem al medio de cultivo. Esta baja concentración de imipenem fue suficiente, para incrementar la sensibilidad del ensayo y observar así el efecto que se producía sobre la composición del PG. Para evaluar los cambios, las cepas recombinantes que portaban las  $\beta$ -lactamasas fueron comparadas con la cepa control de *E. coli* no portadora de  $\beta$ -lactamasas (MG-pB). Los cambios cuantitativos observados en el PG en las cepas de *E. coli* MG1655 que portaban los plásmidos pB-OXA-10-like, pB-OXA-24 y pB-AmpR-SFO-1 producían, como consecuencia, una disminución en el nivel de entrecruzamiento de los muropéptidos lo que se puede atribuir a una disminución de la actividad transpeptidasa, o un aumento de la actividad endopeptidasa, que sería esperable si estas enzimas tuvieran esa actividad *in vivo*; y un aumento en la longitud media de las cadenas que puede ser debido al aumento de la actividad transglicosilasa, aunque

también podría tratarse de una disminución de las transpeptidasas líticas responsables de cortar las cadenas glicosídicas.

La expresión de las diferentes  $\beta$ -lactamasas no tuvo ningún efecto visible en la tasa de crecimiento de la cepa de *E. coli* bajo condiciones experimentales no competitivas. Aunque la presencia de genes de resistencia codificados por plásmidos está normalmente asociado con un coste biológico en la capacidad de crecimiento de la bacteria, en monocultivo (153), en nuestro modelo isogénico se observó que las  $\beta$ -lactamasas estudiadas no afectaban a la tasa de crecimiento ya que fue similar para todos los aislamientos.

La competición *in vitro* y en un modelo animal, fue concordante y mostró que el coste biológico aumentaba en presencia de  $\beta$ -lactamasas de tipo OXA (OXA-10-like y OXA-24) y AmpR-SFO-1, dejando patente la desventaja para la selección de estas bacterias resistentes cuando no hay antibióticos presentes.

Está descrito que el coste biológico es el principal factor que conduce a la reducción en la frecuencia de bacterias resistentes en ausencia de antibióticos (154). Mientras que esta afirmación es cierta para algunas  $\beta$ -lactamasas, en otras no se observa que produzcan un aumento del coste biológico de la bacteria.

Es importante hacer hincapié en el efecto sobre el coste biológico obtenido con SFO-1 con su regulador positivo, situado en posición *upstream*, AmpR. Cuando el gen carece de este regulador positivo el efecto se suprime (126), lo que demuestra que está directamente relacionado con la expresión de la  $\beta$ -lactamasa SFO-1.

Hasta el momento no se ha dado ninguna explicación clara al hecho de que algunas  $\beta$ -lactamasas son frecuentemente aisladas en unos géneros determinados de bacterias, y en cambio son escasamente detectadas en otros. La identificación de las diferencias en el impacto que presentan las diferentes  $\beta$ -lactamasas expresadas en miembros de la familia Enterobacteriaceae podría ayudar en el entendimiento de por qué algunas  $\beta$ -lactamasas están más ampliamente extendidas en algunos bacilos Gram-negativos que en otros, más allá de la propia estructura o plataforma genética que sustenta el gen de la  $\beta$ -lactamasa. Mientras que la mayoría de las BLEE han sido descritas en *E. coli*, *K. pneumoniae*, y otras Enterobacteriaceae, la mayoría de las BLEE de tipo OXA y las carbapenemasas han sido principalmente encontradas en *P. aeruginosa* y *Acinetobacter* spp., especialmente en este último. Las enzimas de tipo OXA que hidrolizan carbapenemes se encuentran frecuentemente en *A. baumannii* (155), mientras que las enzimas de tipo OXA con un espectro extendido en *P. aeruginosa*, y la enzima que hidroliza carbapenemes OXA-48 en miembros de la familia Enterobacteriaceae (156). Sin embargo, hay que tener en cuenta las

diferencias tanto en la estructura como en la bioquímica de OXA-48 con respecto al resto de las OXAs descritas en *Acinetobacter*. Hasta ahora, sólo se ha descrito OXA-10 en dos aislamientos únicos de *Providencia* spp. (157) y otra  $\beta$ -lactamasa OXA-10-like en Enterobacteriaceae denominada OXA-101 (158). Con respecto a la OXA-24, hasta ahora no ha sido encontrada en la familia Enterobacteriaceae, detectándose mayoritariamente en *A. baumannii* (159).

La  $\beta$ -lactamasa SFO-1 se ha encontrado sólo en aislamientos de *E. cloacae* (126, 160), pero debido a su localización plasmídica, cabría la posibilidad de diseminación a otras especies, hecho que al no haberse producido confirma nuestra hipótesis. La SFO-1 es la única  $\beta$ -lactamasa de clase A con el gen *ampR upstream* (126). Se han realizado pocos estudios que describan enzimas de clase C codificadas en plásmidos (161-164) con el gen *ampR* actuando como inductor de la expresión.

Con todos estos datos, podría ser interesante proponer una hipótesis en la cual la baja diseminación de estas enzimas en Enterobacteriaceae podría estar relacionada con sus efectos en los cambios en la composición del PG y, por lo tanto, en la disminución del coste biológico en ausencia de antibióticos.

Hipotéticamente y, basándose en la disminución de la *fitness* biológica obtenida en los experimentos competitivos causada por las  $\beta$ -lactamasas OXA-10-like, OXA-24 y AmpR-SFO-1, en ausencia de antibióticos, las cepas de *E. coli* que expresan estas enzimas no serían capaces de dominar la población bacteriana. De acuerdo con esta hipótesis, en ausencia de antibióticos estas cepas serían desplazadas y la frecuencia de aislamiento sería más baja. Además, es muy importante el hecho de que los datos *in vitro* hayan sido confirmados en un modelo *in vivo* de ratón con infección sistémica.

No se observó ninguna relación entre la producción de biofilm y las modificaciones del PG, ya que la expresión de las proteínas AmpR-SFO-1, OXA-24 y OXA-10-like producía una disminución en la producción de biofilm del mismo modo que la expresión de la  $\beta$ -lactamasa TEM-1, que no producía cambios en el PG. La disminución en la formación de biofilm ha sido atribuida previamente a la presencia de  $\beta$ -lactamasas de clase A y clase D, específicamente TEM-1 y OXA-3 (165). Se ha hipotetizado que los fenotipos de biofilm de los transformantes que expresan  $\beta$ -lactamasas de clase A y clase D podría estar provocada por la capacidad de estas  $\beta$ -lactamasas de unirse al PG ó modificarlo (165), aunque esto no ha sido demostrado en nuestro modelo.

En conclusión, la expresión de algunas  $\beta$ -lactamasas específicas está asociada con los cambios en la pared celular de la bacteria huésped, lo cual se traduce en una pérdida de



*fitness in vivo* e *in vitro*. Este hecho podría explicar la selección “natural” de  $\beta$ -lactamasas en un género específico bacteriano y proporcionar importantes datos con respecto a la epidemiología de las  $\beta$ -lactamasas y a la baja tasa de aislamiento en géneros concretos. Además, la interacción con el PG observada con algunas de las  $\beta$ -lactamasas estudiadas, como la AmpR-SFO-1, OXA-10-*like*, y OXA-24, apoya la hipótesis de que las PBPs y las  $\beta$ -lactamasas han evolucionado a partir de un gen antepasado común (46).



## **5. CONCLUSIONES**



## 5. CONCLUSIONES

Las principales conclusiones que pueden extraerse a partir de los datos obtenidos en el presente trabajo son las siguientes:

### 5.1. Conclusiones capítulo I

5.1.1. Se demuestra la capacidad de movilización de un plásmido que porta el gen *bla*<sub>CTX-M-32</sub> mediante la descripción de la transmisión *in vivo* entre diferentes especies de enterobacterias.

5.1.2. Se describe la secuencia de inserción *IS1* como un elemento que genera un mecanismo de regulación negativa sobre la expresión de la *bla*<sub>CTX-M-32</sub>, debido a la interrupción de la región promotora.

### 5.2. Conclusiones capítulo II

5.2.1. Se describe por primera vez un brote epidémico causado por una cepa multirresistente de *E. cloacae* productora de SFO-1.

5.2.2. Se detalla por primera vez el entorno genético del gen *bla*<sub>SFO-1</sub>, hallándose la presencia de un transposón compuesto, formado por dos *IS26*, que podría jugar un papel importante en su diseminación.

5.2.3. Los principales factores de riesgo asociados a la adquisición de cepas EbSF fueron la administración previa de antibióticos  $\beta$ -lactámicos, la traqueostomía, la hospitalización previa y el fallo renal crónico.

5.2.4. Podemos concluir que las características epidemiológicas de *E. cloacae* son muy similares a las previamente descritas para *K. pneumoniae*, ya que se trata de un microorganismo de carácter nosocomial y los aislamientos normalmente guardan una relación clonal.

### 5.3. Conclusiones capítulo III

5.3.1. Se ha demostrado por primera vez que la presencia de las  $\beta$ -lactamasas OXA-24, un derivado de OXA-10 y AmpR-SFO-1, en un aislamiento de *E. coli*, es capaz de

modificar la composición del PG, provocando una disminución en la cantidad de dímeros, trímeros, muropéptidos anhidros y pentapéptidos y un aumento de monómeros y muropéptidos unidos a lipoproteína. Como consecuencia de estos cambios, se observa una disminución en el nivel de entrecruzamiento de los muropéptidos y un aumento en la longitud media de las cadenas.

5.3.2. Teniendo en cuenta que el efecto producido por la expresión de las diferentes  $\beta$ -lactamasas no es universal y las conclusiones son específicas en nuestro modelo podemos decir que los resultados del análisis de la composición del PG fueron similares con la presencia de las siguientes  $\beta$ -lactamasas: TEM-1, TEM-29, CTX-M-32, CTX-M-8, CTX-M-2, CTX-M-14, SFO-1 (sin la presencia del gen regulador AmpR), VIM-1 y FOX-4, no observándose ningún cambio en el PG.

5.3.3. Los cambios observados en la composición del PG debido a la presencia de las  $\beta$ -lactamasas de tipo OXA y AmpR-SFO-1 se relacionan con una pérdida de *fitness* observada tanto en experimentos *in vitro* como *in vivo*.

5.3.4. La disminución en la *fitness* podría explicar la selección “natural” de  $\beta$ -lactamasas en un género específico bacteriano y proporcionar importantes datos con respecto a la epidemiología de las  $\beta$ -lactamasas y a la baja tasa de aislamiento en determinados géneros.

5.3.5. La expresión de algunas  $\beta$ -lactamasas se asoció a una disminución en la producción de biofilm, aunque este efecto no se relacionó con los cambios en el PG.

5.3.6. La interacción observada entre las  $\beta$ -lactamasas y el PG, apoyaría la hipótesis de que las PBPs y las  $\beta$ -lactamasas han evolucionado a partir de un gen antepasado común.

## **6. REFERENCIAS**





## 6. REFERENCIAS

1. Andersson DI, Hughes D. Antibiotic resistance and its cost: is it possible to reverse resistance? *Nat Rev Microbiol*. 2010; 8(4):260-71.
2. Spellberg B, Guidos R, Gilbert D, Bradley J, Boucher HW, Scheld WM, et al. The epidemic of antibiotic-resistant infections: a call to action for the medical community from the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis*. 2008; 46(2):155-64.
3. Livermore DM. Introduction: the challenge of multiresistance. *Int J Antimicrob Agents*. 2007; 29 Suppl 3:S1-7.
4. Vila-Farres X, Giralt E, Vila J. Update of peptides with antibacterial activity. *Curr Med Chem*. 2012. Sep 13 Epub ahead of print.
5. Bush K, Macielag MJ. New beta-lactam antibiotics and beta-lactamase inhibitors. *Expert Opin Ther Pat*. 2010; 20(10):1277-93.
6. Wise R. Antimicrobial resistance: priorities for action. *J Antimicrob Chemother*. 2002; 49(4):585-6.
7. Murray PR, editor. *Manual of clinical microbiology*. Washington (D.C.): ASM Press. 2007.
8. Vollmer W, Blanot D, de Pedro MA. Peptidoglycan structure and architecture. *FEMS Microbiol Rev*. 2008 ;32(2):149-67.
9. Macheboeuf P, Contreras-Martel C, Job V, Dideberg O, Dessen A. Penicillin binding proteins: key players in bacterial cell cycle and drug resistance processes. *FEMS Microbiol Rev*. 2006; 30(5):673-91.
10. Nanninga N. Morphogenesis of *Escherichia coli*. *Microbiol Mol Biol Rev*. 1998; 62(1):110-29.
11. Sauvage E, Kerff F, Terrak M, Ayala JA, Charlier P. The penicillin-binding proteins: structure and role in peptidoglycan biosynthesis. *FEMS Microbiol Rev*. 2008; 32(2):234-58.
12. Malachowa N, DeLeo FR. Mobile genetic elements of *Staphylococcus aureus*. *Cell Mol Life Sci*. 2010; 67(18):3057-71.

13. Babic A, Lindner AB, Vulic M, Stewart EJ, Radman M. Direct visualization of horizontal gene transfer. *Science*. 2008; 319(5869):1533-6.
14. Frost LS, Leplae R, Summers AO, Toussaint A. Mobile genetic elements: the agents of open source evolution. *Nat Rev Microbiol*. 2005; 3(9):722-32.
15. Rumbo C, Fernandez-Moreira E, Merino M, Poza M, Mendez JA, Soares NC, et al. Horizontal transfer of the OXA-24 carbapenemase gene via outer membrane vesicles: a new mechanism of dissemination of carbapenem resistance genes in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011; 55(7):3084-90.
16. Klieve AV, Yokoyama MT, Forster RJ, Ouwerkerk D, Bain PA, Mawhinney EL. Naturally occurring DNA transfer system associated with membrane vesicles in cellulolytic *Ruminococcus* spp. of ruminal origin. *Appl Environ Microbiol*. 2005; 71(8):4248-53.
17. Yaron S, Kolling GL, Simon L, Matthews KR. Vesicle-mediated transfer of virulence genes from *Escherichia coli* O157:H7 to other enteric bacteria. *Appl Environ Microbiol*. 2000; 66(10):4414-20.
18. Toleman MA, Walsh TR. Combinatorial events of insertion sequences and ICE in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol Rev*. 2011; 35(5):912-35.
19. Francia MV, Varsaki A, Garcillan-Barcia MP, Latorre A, Drainas C, de la Cruz F. A classification scheme for mobilization regions of bacterial plasmids. *FEMS Microbiol Rev*. 2004; 28(1):79-100.
20. Carattoli A. Resistance plasmid families in Enterobacteriaceae. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009; 53(6):2227-38.
21. Mahillon J, Chandler M. Insertion sequences. *Microbiol Mol Biol Rev* 1998; 62(3):725-74.
22. Toleman MA, Bennett PM, Walsh TR. ISCR elements: novel gene-capturing systems of the 21st century? *Microbiol Mol Biol Rev*. 2006; 70(2):296-316.
23. Toleman MA, Walsh TR. Evolution of the ISCR3 group of ISCR elements. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; 52(10):3789-91.
24. Berg DE, M. M. Howe and editors. In mobile DNA. Washington (D.C.): ASM Press. 1989.

25. Kholodii GY, Mindlin SZ, Bass IA, Yurieva OV, Minakhina SV, Nikiforov VG. Four genes, two ends, and a *res* region are involved in transposition of Tn5053: a paradigm for a novel family of transposons carrying either a *mer* operon or an integron. *Mol Microbiol.* 1995; 17(6):1189-200.
26. Rice LB. Tn916 family conjugative transposons and dissemination of antimicrobial resistance determinants. *Antimicrob Agents Chemother.* 1998; 42(8):1871-7.
27. Hall RM, Collis CM. Mobile gene cassettes and integrons: capture and spread of genes by site-specific recombination. *Mol Microbiol.* 1995; 15(4):593-600.
28. Boucher Y, Labbate M, Koenig JE, Stokes HW. Integrons: mobilizable platforms that promote genetic diversity in bacteria. *Trends Microbiol.* 2007; 15(7):301-9.
29. Fluit AC, Schmitz FJ. Resistance integrons and super-integrons. *Clin Microbiol Infect.* 2004; 10(4):272-88.
30. Kong KF, Schneper L, Mathee K. Beta-lactam antibiotics: from antibiosis to resistance and bacteriology. *APMIS.* 2009; 118(1):1-36.
31. Suarez C, Gudiol F. Beta-lactam antibiotics. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2009; 27(2):116-29.
32. García J, editor. *Antimicrobianos en medicina.* Barcelona: Prous Science SA. 2006.
33. Kohanski MA, Dwyer DJ, Collins JJ. How antibiotics kill bacteria: from targets to networks. *Nat Rev Microbiol.* 2010; 8(6):423-35.
34. Llarrull LI, Testero SA, Fisher JF, Mobashery S. The future of the beta-lactams. *Curr Opin Microbiol.* 2010;13(5):551-7.
35. Zapun A, Contreras-Martel C, Vernet T. Penicillin-binding proteins and beta-lactam resistance. *FEMS Microbiol Rev.* 2008; 32(2):361-85.
36. Yang Q, Wang H, Sun H, Chen H, Xu Y, Chen M. Phenotypic and genotypic characterization of Enterobacteriaceae with decreased susceptibility to carbapenems: results from large hospital-based surveillance studies in China. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010; 54(1):573-7.
37. Martinez-Martinez L, Pascual A, Hernandez-Alles S, Alvarez-Diaz D, Suarez AI, Tran J, et al. Roles of beta-lactamases and porins in activities of carbapenems and

cephalosporins against *Klebsiella pneumoniae*. Antimicrob Agents Chemother. 1999; 43(7):1669-73.

38. Webster DP, Gaulton T, Woodford N, Pike R, Turton J, Perry C, et al. Emergence of carbapenem resistance due to porin loss in an extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing *Klebsiella pneumoniae* strain during meropenem therapy. Int J Antimicrob Agents. 2010; 36(6):575-6.

39. Chia JH, Siu LK, Su LH, Lin HS, Kuo AJ, Lee MH, et al. Emergence of carbapenem-resistant *Escherichia coli* in Taiwan: resistance due to combined CMY-2 production and porin deficiency. J Chemother. 2009; 21(6):621-6.

40. Fernandes P, Ferreira BS, Cabral JM. Solvent tolerance in bacteria: role of efflux pumps and cross-resistance with antibiotics. Int J Antimicrob Agents. 2003; 22(3):211-6.

41. Piddock LJ. Clinically relevant chromosomally encoded multidrug resistance efflux pumps in bacteria. Clin Microbiol Rev. 2006; 19(2):382-402.

42. Nikaido H. Multidrug resistance in bacteria. Annu Rev Biochem. 2009; 78:119-46.

43. Perez A, Canle D, Latasa C, Poza M, Beceiro A, Tomas Mdel M, et al. Cloning, nucleotide sequencing, and analysis of the AcrAB-TolC efflux pump of *Enterobacter cloacae* and determination of its involvement in antibiotic resistance in a clinical isolate. Antimicrob Agents Chemother. 2007; 51(9):3247-53.

44. Ambler RP. The structure of beta-lactamases. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 1980; 289(1036):321-31.

45. Bush K, Jacoby GA. Updated functional classification of beta-lactamases. Antimicrob Agents Chemother. 2009; 54(3):969-76.

46. Massova I, Mobashery S. Kinship and diversification of bacterial penicillin-binding proteins and beta-lactamases. Antimicrob Agents Chemother. 1998; 42(1):1-17.

47. Meroueh SO, Minasov G, Lee W, Shoichet BK, Mobashery S. Structural aspects for evolution of beta-lactamases from penicillin-binding proteins. J Am Chem Soc. 2003; 125(32):9612-8.

48. Livermore DM. Radiolabelling of penicillin-binding proteins (PBPs) in intact *Pseudomonas aeruginosa* cells: consequences of beta-lactamase activity by PBP-5. J Antimicrob Chemother. 1987; 19(6):733-42.
49. Paterson DL, Bonomo RA. Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update. Clin Microbiol Rev. 2005; 18(4):657-86.
50. Datta N, Kontomichalou P. Penicillinase synthesis controlled by infectious R factors in Enterobacteriaceae. Nature. 1965; 208(5007):239-41.
51. Turner PJ. Extended-spectrum beta-lactamases. Clin Infect Dis. 2005; 41 Suppl 4:S273-5.
52. Bonnet R. Growing group of extended-spectrum beta-lactamases: the CTX-M enzymes. Antimicrob Agents Chemother. 2004; 48(1):1-14.
53. Livermore DM, Canton R, Gniadkowski M, Nordmann P, Rossolini GM, Arlet G, et al. CTX-M: changing the face of ESBLs in Europe. J Antimicrob Chemother. 2007; 59(2):165-74.
54. Canton R, Coque TM. The CTX-M beta-lactamase pandemic. Curr Opin Microbiol. 2006;9(5):466-75.
55. Poirel L, Gniadkowski M, Nordmann P. Biochemical analysis of the ceftazidime-hydrolysing extended-spectrum beta-lactamase CTX-M-15 and of its structurally related beta-lactamase CTX-M-3. J Antimicrob Chemother. 2002; 50(6):1031-4.
56. Diaz MA, Hernandez-Bello JR, Rodriguez-Baño J, Martinez-Martinez L, Calvo J, Blanco J, et al. Diversity of *Escherichia coli* strains producing extended-spectrum beta-lactamases in Spain: second nationwide study. J Clin Microbiol. 2010; 48(8):2840-5.
57. Mora A, Blanco M, Lopez C, Mamani R, Blanco JE, Alonso MP, et al. Emergence of clonal groups O1:HNM-D-ST59, O15:H1-D-ST393, O20:H34/HNM-D-ST354, O25b:H4-B2-ST131 and ONT:H21,42-B1-ST101 among CTX-M-14-producing *Escherichia coli* clinical isolates in Galicia, northwest Spain. Int J Antimicrob Agents. 2011; 37(1):16-21.
58. Blanco M, Alonso MP, Nicolas-Chanoine MH, Dahbi G, Mora A, Blanco JE, et al. Molecular epidemiology of *Escherichia coli* producing extended-spectrum beta-lactamases in Lugo (Spain): dissemination of clone O25b:H4-ST131 producing CTX-M-15. J Antimicrob Chemother. 2009; 63(6):1135-41.

59. Bou G, Cartelle M, Tomas M, Canle D, Molina F, Moure R, et al. Identification and broad dissemination of the CTX-M-14 beta-lactamase in different *Escherichia coli* strains in the northwest area of Spain. J Clin Microbiol. 2002; 40(11):4030-6.
60. Weldhagen GF, Poirel L, Nordmann P. Ambler class A extended-spectrum beta-lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*: novel developments and clinical impact. Antimicrob Agents Chemother. 2003;47(8):2385-92.
61. Pitout JD, Laupland KB. Extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae: an emerging public-health concern. Lancet Infect Dis. 2008; 8(3):159-66.
62. Canton R, Novais A, Valverde A, Machado E, Peixe L, Baquero F, et al. Prevalence and spread of extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae in Europe. Clin Microbiol Infect. 2008; 14 Suppl 1:144-53.
63. Coque TM, Novais A, Carattoli A, Poirel L, Pitout J, Peixe L, et al. Dissemination of clonally related *Escherichia coli* strains expressing extended-spectrum beta-lactamase CTX-M-15. Emerg Infect Dis. 2008; 14(2):195-200.
64. Aibinu I, Odugbemi T, Koenig W, Ghebremedhin B. Sequence Type ST131 and ST10 Complex (ST617) predominant among CTX-M-15-producing *Escherichia coli* isolates from Nigeria. Clin Microbiol Infect. 2012; 18(3):E49-51.
65. Peirano G, Pitout JD. Molecular epidemiology of *Escherichia coli* producing CTX-M beta-lactamases: the worldwide emergence of clone ST131 O25:H4. Int J Antimicrob Agents. 2010; 35(4):316-21.
66. Coque TM, Baquero F, Canton R. Increasing prevalence of ESBL-producing Enterobacteriaceae in Europe. Euro Surveill. 2008; 13(47).
67. Oteo J, Cercenado E, Fernandez-Romero S, Saez D, Padilla B, Zamora E, et al. Extended-Spectrum-beta-Lactamase-Producing *Escherichia coli* as a Cause of Pediatric Infections: Report of a Neonatal Intensive Care Unit Outbreak Due to a CTX-M-14-Producing Strain. Antimicrob Agents Chemother. 2012; 56(1):54-8.
68. Kassis-Chikhani N, Decre D, Gautier V, Burghoffer B, Saliba F, Mathieu D, et al. First outbreak of multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* carrying *bla<sub>VIM-1</sub>* and *bla<sub>SHV-5</sub>* in a French university hospital. J Antimicrob Chemother. 2006; 57(1):142-5.

69. Yoon YK, Cheong HW, Pai H, Roh KH, Kim JY, Park DW, et al. Molecular analysis of a prolonged spread of *Klebsiella pneumoniae* co-producing DHA-1 and SHV-12 beta-lactamases. J Microbiol. 2011; 49(3):363-8.
70. Leavitt A, Navon-Venezia S, Chmelnitsky I, Schwaber MJ, Carmeli Y. Emergence of KPC-2 and KPC-3 in carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains in an Israeli hospital. Antimicrob Agents Chemother. 2007; 51(8):3026-9.
71. Navon-Venezia S, Leavitt A, Schwaber MJ, Rasheed JK, Srinivasan A, Patel JB, et al. First report on a hyperepidemic clone of KPC-3-producing *Klebsiella pneumoniae* in Israel genetically related to a strain causing outbreaks in the United States. Antimicrob Agents Chemother. 2009; 53(2):818-20.
72. Agodi A, Voulgari E, Barchitta M, Politi L, Koumaki V, Spanakis N, et al. Containment of an outbreak of KPC-3-producing *Klebsiella pneumoniae* in Italy. J Clin Microbiol. 2011; 49(11):3986-9.
73. Leavitt A, Carmeli Y, Chmelnitsky I, Goren MG, Ofek I, Navon-Venezia S. Molecular epidemiology, sequence types, and plasmid analyses of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Israel. Antimicrob Agents Chemother. 2010; 54(7):3002-6.
74. Cai JC, Zhou HW, Zhang R, Chen GX. Emergence of *Serratia marcescens*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Escherichia coli* Isolates possessing the plasmid-mediated carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase KPC-2 in intensive care units of a Chinese hospital. Antimicrob Agents Chemother. 2008; 52(6):2014-8.
75. Mezzatesta ML, Gona F, Caio C, Petrolito V, Sciortino D, Sciacca A, et al. Outbreak of KPC-3-producing, and colistin-resistant, *Klebsiella pneumoniae* infections in two Sicilian hospitals. Clin Microbiol Infect. 2011; 17(9):1444-7.
76. Villegas MV, Lolans K, Correa A, Suarez CJ, Lopez JA, Vallejo M, et al. First detection of the plasmid-mediated class A carbapenemase KPC-2 in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* from South America. Antimicrob Agents Chemother. 2006; 50(8):2880-2.
77. Novais A, Baquero F, Machado E, Canton R, Peixe L, Coque TM. International spread and persistence of TEM-24 is caused by the confluence of highly penetrating Enterobacteriaceae clones and an IncA/C2 plasmid containing Tn1696:Tn1 and IS5075-Tn21. Antimicrob Agents Chemother. 2010; 54(2):825-34.

78. Bennett PM. Genome plasticity: insertion sequence elements, transposons and integrons, and DNA rearrangement. *Methods Mol Biol.* 2004; 266:71-113.
79. Chong Y, Ito Y, Kamimura T. Genetic evolution and clinical impact in extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *Infect Genet Evol.* 2011; 11(7):1499-504.
80. Jacoby GA, Sutton L. Properties of plasmids responsible for production of extended-spectrum beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 1991; 35(1):164-9.
81. Zienkiewicz M, Kern-Zdanowicz I, Golebiewski M, Zylinska J, Mieczkowski P, Gniadkowski M, et al. Mosaic structure of p1658/97, a 125-kilobase plasmid harboring an active amplicon with the extended-spectrum beta-lactamase gene *bla<sub>SHV-5</sub>*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007; 51(4):1164-71.
82. Novais A, Canton R, Moreira R, Peixe L, Baquero F, Coque TM. Emergence and dissemination of *Enterobacteriaceae* isolates producing CTX-M-1-like enzymes in Spain are associated with IncFII (CTX-M-15) and broad-host-range (CTX-M-1, -3, and -32) plasmids. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007; 51(2):796-9.
83. Garcia A, Navarro F, Miro E, Villa L, Mirelis B, Coll P, et al. Acquisition and diffusion of *bla<sub>CTX-M-9</sub>* gene by R478-IncHI2 derivative plasmids. *FEMS Microbiol Lett.* 2007; 271(1):71-7.
84. Mshana SE, Imirzalioglu C, Hossain H, Hain T, Domann E, Chakraborty T. Conjugative IncFI plasmids carrying CTX-M-15 among *Escherichia coli* ESBL producing isolates at a University hospital in Germany. *BMC Infect Dis.* 2009; 9:97.
85. Hammami S, Boubaker IB, Saidani M, Lakhal E, Hassen AB, Kamoun A, et al. Characterization and molecular epidemiology of extended spectrum beta-lactamase producing *Enterobacter cloacae* isolated from a Tunisian hospital. *Microb Drug Resist.* 2012; 18(1): 59-65.
86. Canton R, Oliver A, Coque TM, Varela Mdel C, Perez-Diaz JC, Baquero F. Epidemiology of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacter* isolates in a Spanish hospital during a 12-year period. *J Clin Microbiol.* 2002; 40(4):1237-43.
87. Lartigue MF, Poirel L, Nordmann P. Diversity of genetic environment of *bla<sub>CTX-M</sub>* genes. *FEMS Microbiol Lett.* 2004; 234(2):201-7.



88. Poirel L, Decousser JW, Nordmann P. Insertion sequence *ISEcp1B* is involved in expression and mobilization of a *bla*<sub>CTX-M</sub> beta-lactamase gene. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003; 47(9):2938-45.
89. Ford PJ, Avison MB. Evolutionary mapping of the SHV beta-lactamase and evidence for two separate IS26-dependent *bla*<sub>SHV</sub> mobilization events from the *Klebsiella pneumoniae* chromosome. *J Antimicrob Chemother.* 2004; 54(1):69-75.
90. Ensor VM, Shahid M, Evans JT, Hawkey PM. Occurrence, prevalence and genetic environment of CTX-M beta-lactamases in Enterobacteriaceae from Indian hospitals. *J Antimicrob Chemother.* 2006; 58(6):1260-3.
91. Cullik A, Pfeifer Y, Prager R, von Baum H, Witte W. A novel IS26 structure surrounds *bla*<sub>CTX-M</sub> genes in different plasmids from German clinical *Escherichia coli* isolates. *J Med Microbiol.* 2010; 59(Pt 5):580-7.
92. Doumith M, Dhanji H, Ellington MJ, Hawkey P, Woodford N. Characterization of plasmids encoding extended-spectrum beta-lactamases and their addiction systems circulating among *Escherichia coli* clinical isolates in the UK. *J Antimicrob Chemother.* 2011; 67(4):878-85.
93. Arduino SM, Catalano M, Orman BE, Roy PH, Centron D. Molecular epidemiology of orf513-bearing class 1 integrons in multiresistant clinical isolates from Argentinean hospitals. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003; 47(12):3945-9.
94. Novais A, Canton R, Valverde A, Machado E, Galan JC, Peixe L, et al. Dissemination and persistence of *bla*<sub>CTX-M-9</sub> are linked to class 1 integrons containing *CR1* associated with defective transposon derivatives from *Tn402* located in early antibiotic resistance plasmids of IncHI2, IncP1-alpha, and IncFI groups. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006; 50(8):2741-50.
95. Lartigue MF, Poirel L, Aubert D, Nordmann P. *In vitro* analysis of *ISEcp1B*-mediated mobilization of naturally occurring beta-lactamase gene *bla*<sub>CTX-M</sub> of *Kluyvera ascorbata*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006; 50(4):1282-6.
96. Naseer U, Sundsfjord A. The CTX-M conundrum: dissemination of plasmids and *Escherichia coli* clones. *Microb Drug Resist.* 2011; 17(1):83-97.
97. Roy Chowdhury P, Ingold A, Vanegas N, Martinez E, Merlino J, Merkier AK, et al. Dissemination of multiple drug resistance genes by class 1 integrons in *Klebsiella*

*pneumoniae* isolates from four countries: a comparative study. Antimicrob Agents Chemother. 2011; 55(7):3140-9.

98. Tian GB, Garcia J, Adams-Haduch JM, Evangelista JP, Destura RV, Wang HN, et al. CTX-M as the predominant extended-spectrum beta-lactamases among Enterobacteriaceae in Manila, Philippines. J Antimicrob Chemother. 2010; 65(3):584-6.

99. Hawkey PM, Jones AM. The changing epidemiology of resistance. J Antimicrob Chemother. 2009; 64 Suppl 1:i3-10.

100. Asensio A, Oliver A, Gonzalez-Diego P, Baquero F, Perez-Diaz JC, Ros P, et al. Outbreak of a multiresistant *Klebsiella pneumoniae* strain in an intensive care unit: antibiotic use as risk factor for colonization and infection. Clin Infect Dis. 2000; 30(1):55-60.

101. Kang CI, Wi YM, Lee MY, Ko KS, Chung DR, Peck KR, et al. Epidemiology and risk factors of community-onset infections caused by extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli*. J Clin Microbiol. 2012; 50(2): 312-7.

102. Rodriguez-Baño J, Navarro MD, Romero L, Martinez-Martinez L, Muniain MA, Perea EJ, et al. Epidemiology and clinical features of infections caused by extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in nonhospitalized patients. J Clin Microbiol. 2004; 42(3):1089-94.

103. Garcia CS, de la Gandara MP, Garcia FJ. Extended-spectrum beta-lactamases in enterobacteria other than *Escherichia coli* and *Klebsiella*. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2010; 28 Supl 1:12-18.

104. Jacoby GA. AmpC beta-lactamases. Clin Microbiol Rev. 2009; 22(1):161-82, Table of Contents.

105. Paterson DL. Resistance in gram-negative bacteria: Enterobacteriaceae. Am J Infect Control. 2006; 34(5 Suppl 1):S20-8; discussion S64-73.

106. Carrer A, Lassel L, Fortineau N, Mansouri M, Anguel N, Richard C, et al. Outbreak of CTX-M-15-producing *Klebsiella pneumoniae* in the intensive care unit of a French hospital. Microb Drug Resist. 2009; 15(1):47-54.

107. Conte MP, Venditti M, Chiarini F, D'Ettorre G, Zamboni I, Scoarughi GL, et al. Extended Spectrum Beta-Lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* outbreaks during a third generation cephalosporin restriction policy. J Chemother. 2005; 17(1):66-73.

108. Fang H, Lundberg C, Olsson-Liljequist B, Hedin G, Lindback E, Rosenberg A, et al. Molecular epidemiological analysis of *Escherichia coli* isolates producing extended-spectrum beta-lactamases for identification of nosocomial outbreaks in Stockholm, Sweden. *J Clin Microbiol.* 2004; 42(12):5917-20.
109. Mena A, Plasencia V, Garcia L, Hidalgo O, Ayestaran JI, Alberti S, et al. Characterization of a large outbreak by CTX-M-1-producing *Klebsiella pneumoniae* and mechanisms leading to *in vivo* carbapenem resistance development. *J Clin Microbiol.* 2006; 44(8):2831-7.
110. Moissenet D, Salauze B, Clermont O, Bingen E, Arlet G, Denamur E, et al. Meningitis caused by *Escherichia coli* producing TEM-52 extended-spectrum beta-lactamase within an extensive outbreak in a neonatal ward: epidemiological investigation and characterization of the strain. *J Clin Microbiol.* 2010; 48(7):2459-63.
111. Velasco C, Rodriguez-Baño J, Garcia L, Diaz P, Lupion C, Duran L, et al. Eradication of an extensive outbreak in a neonatal unit caused by two sequential *Klebsiella pneumoniae* clones harbouring related plasmids encoding an extended-spectrum beta-lactamase. *J Hosp Infect.* 2009; 73(2):157-63.
112. Vranic-Ladavac M, Bosnjak Z, Beader N, Barisic N, Kalenic S, Bedenic B. Clonal spread of CTX-M-15-producing *Klebsiella pneumoniae* in a Croatian hospital. *J Med Microbiol.* 2010; 59(Pt 9):1069-78.
113. Moriguchi N, Itahashi Y, Tabata N, Yamazumi T, Furuta I, Shibata N, et al. Outbreak of CTX-M-3-type extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacter cloacae* in a pediatric ward. *J Infect Chemother.* 2007; 13(4):263-6.
114. Paauw A, Fluit AC, Verhoef J, Leverstein-van Hall MA. *Enterobacter cloacae* outbreak and emergence of quinolone resistance gene in Dutch hospital. *Emerg Infect Dis.* 2006; 12(5):807-12.
115. Jiang X, Ni Y, Jiang Y, Yuan F, Han L, Li M, et al. Outbreak of infection caused by *Enterobacter cloacae* producing the novel VEB-3 beta-lactamase in China. *J Clin Microbiol.* 2005; 43(2):826-31.
116. Kartali G, Tzelepi E, Pournaras S, Kontopoulou C, Kontos F, Sofianou D, et al. Outbreak of infections caused by *Enterobacter cloacae* producing the integron-associated

beta-lactamase IBC-1 in a neonatal intensive care unit of a Greek hospital. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002; 46(5):1577-80.

117. Manzur A, Tubau F, Pujol M, Calatayud L, Dominguez MA, Pena C, et al. Nosocomial outbreak due to extended-spectrum-beta-lactamase- producing *Enterobacter cloacae* in a cardiothoracic intensive care unit. *J Clin Microbiol.* 2007; 45(8):2365-9.

118. Cartelle M, del Mar Tomas M, Molina F, Moure R, Villanueva R, Bou G. High-level resistance to ceftazidime conferred by a novel enzyme, CTX-M-32, derived from CTX-M-1 through a single Asp240-Gly substitution. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004; 48(6):2308-13.

119. Sekino N, Sekine Y, Ohtsubo E. *IS1*-encoded proteins, InsA and the InsA-B'-InsB transframe protein (transposase): functions deduced from their DNA-binding ability. *Adv Biophys.* 1995; 31:209-22.

120. Machida Y, Machida C, Ohtsubo E. Insertion element *IS1* encodes two structural genes required for its transposition. *J Mol Biol.* 1984; 177(2):229-45.

121. Paauw A, Verhoef J, Fluit AC, Blok HE, Hopmans TE, Troelstra A, et al. Failure to control an outbreak of qnrA1-positive multidrug-resistant *Enterobacter cloacae* infection despite adequate implementation of recommended infection control measures. *J Clin Microbiol.* 2007; 45(5):1420-5.

122. Gouby A, Neuwirth C, Bourg G, Bouziges N, Carles-Nurit MJ, Despaux E, et al. Epidemiological study by pulsed-field gel electrophoresis of an outbreak of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in a geriatric hospital. *J Clin Microbiol.* 1994; 32(2):301-5.

123. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol.* 1995; 33(9):2233-9.

124. Trevino M, Moldes L, Martinez-Lamas L, Varon C, Regueiro BJ. Carbapenem-resistant *Enterobacter cloacae* and the emergence of metallo-beta-lactamase-producing strains in a third-level hospital (Santiago de Compostela, NW Spain). *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2009; 28(10):1253-8.

125. Fernandez A, Gil E, Cartelle M, Perez A, Beceiro A, Mallo S, et al. Interspecies spread of CTX-M-32 extended-spectrum beta-lactamase and the role of the insertion

sequence *IS1* in down-regulating *bla*<sub>CTX-M</sub> gene expression. J Antimicrob Chemother. 2007; 59(5):841-7.

126. Matsumoto Y, Inoue M. Characterization of SFO-1, a plasmid-mediated inducible class A beta-lactamase from *Enterobacter cloacae*. Antimicrob Agents Chemother. 1999; 43(2):307-13.

127. Morosini MI, Ayala JA, Baquero F, Martinez JL, Blazquez J. Biological cost of AmpC production for *Salmonella enterica* serotype *Typhimurium*. Antimicrob Agents Chemother. 2000; 44(11):3137-43.

128. Mroczkowska JE, Barlow M. Fitness trade-offs in *bla*<sub>TEM</sub> evolution. Antimicrob Agents Chemother. 2008; 52(7):2340-5.

129. Andersson DI, Levin BR. The biological cost of antibiotic resistance. Curr Opin Microbiol. 1999; 2(5):489-93.

130. Luo N, Pereira S, Sahin O, Lin J, Huang S, Michel L, et al. Enhanced *in vivo* fitness of fluoroquinolone-resistant *Campylobacter jejuni* in the absence of antibiotic selection pressure. Proc Natl Acad Sci USA. 2005; 102(3):541-6.

131. Suwalak S, Voravuthikunchai SP. Morphological and ultrastructural changes in the cell structure of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 following treatment with *Quercus infectoria* nut galls. J Electron Microsc (Tokyo). 2009; 58(5):315-20.

132. Rodman JS. Struvite stones. Nephron. 1999; 81 Suppl 1:50-9.

133. McLean RJ, Nickel JC, Noakes VC, Costerton JW. An *in vitro* ultrastructural study of infectious kidney stone genesis. Infect Immun. 1985; 49(3):805-11.

134. Parsek MR, Singh PK. Bacterial biofilms: an emerging link to disease pathogenesis. Annu Rev Microbiol. 2003; 57:677-701.

135. Mugnaioli C, Luzzaro F, De Luca F, Brigante G, Amicosante G, Rossolini GM. Dissemination of CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamase genes to unusual hosts. J Clin Microbiol. 2005;43(8):4183-5.

136. Eckert C, Gautier V, Arlet G. DNA sequence analysis of the genetic environment of various *bla*<sub>CTX-M</sub> genes. J Antimicrob Chemother. 2006; 57(1):14-23.

137. Smet A, Van Nieuwerburgh F, Vandekerckhove TT, Martel A, Deforce D, Butaye P, et al. Complete nucleotide sequence of CTX-M-15-plasmids from clinical

*Escherichia coli* isolates: insertional events of transposons and insertion sequences. PLoS One. 2010; 5(6):e11202.

138. Rodriguez-Baño J, Pascual A. Clinical significance of extended-spectrum beta-lactamases. Expert Rev Anti Infect Ther. 2008; 6(5):671-83.

139. Kelesidis T, Karageorgopoulos DE, Kelesidis I, Falagas ME. Tigecycline for the treatment of multidrug-resistant Enterobacteriaceae: a systematic review of the evidence from microbiological and clinical studies. J Antimicrob Chemother. 2008; 62(5):895-904.

140. Tenover FC. Rapid detection and identification of bacterial pathogens using novel molecular technologies: infection control and beyond. Clin Infect Dis. 2007; 44(3):418-23.

141. Pitout JD, Campbell L, Church DL, Wang PW, Guttman DS, Gregson DB. Using a commercial DiversiLab semiautomated repetitive sequence-based PCR typing technique for identification of *Escherichia coli* clone ST131 producing CTX-M-15. J Clin Microbiol. 2009; 47(4):1212-5.

142. Grisold AJ, Zarfel G, Strenger V, Feierl G, Leitner E, Masoud L, et al. Use of automated repetitive-sequence-based PCR for rapid laboratory confirmation of nosocomial outbreaks. J Infect. 2010; 60(1):44-51.

143. Kim YK, Pai H, Lee HJ, Park SE, Choi EH, Kim J, et al. Bloodstream infections by extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in children: epidemiology and clinical outcome. Antimicrob Agents Chemother. 2002; 46(5):1481-91.

144. Lin MF, Huang ML, Lai SH. Risk factors in the acquisition of extended-spectrum beta-lactamase *Klebsiella pneumoniae*: a case-control study in a district teaching hospital in Taiwan. J Hosp Infect. 2003; 53(1):39-45.

145. Ortega M, Marco F, Soriano A, Almela M, Martinez JA, Munoz A, et al. Analysis of 4758 *Escherichia coli* bacteremia episodes: predictive factors for isolation of an antibiotic-resistant strain and their impact on the outcome. J Antimicrob Chemother. 2009; 63(3):568-74.

146. Tumbarello M, Citton R, Spanu T, Sanguinetti M, Romano L, Fadda G, et al. ESBL-producing multidrug-resistant *Providencia stuartii* infections in a university hospital. J Antimicrob Chemother. 2004; 53(2):277-82.

147. Tumbarello M, Spanu T, Sanguinetti M, Citton R, Montuori E, Leone F, et al. Bloodstream infections caused by extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae*: risk factors, molecular epidemiology, and clinical outcome. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006; 50(2):498-504.
148. Tumbarello M, Sali M, Trecarichi EM, Leone F, Rossi M, Fiori B, et al. Bloodstream infections caused by extended-spectrum-beta-lactamase- producing *Escherichia coli*: risk factors for inadequate initial antimicrobial therapy. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008; 52(9):3244-52.
149. Miriagou V, Carattoli A, Tzelepi E, Villa L, Tzouveleki LS. IS26-associated In4-type integrons forming multiresistance loci in enterobacterial plasmids. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005; 49(8):3541-3.
150. Reddy P, Malczynski M, Obias A, Reiner S, Jin N, Huang J, et al. Screening for extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae among high-risk patients and rates of subsequent bacteremia. *Clin Infect Dis*. 2007; 45(7):846-52.
151. Canton R, Coque TM, Baquero F. Multi-resistant Gram-negative bacilli: from epidemics to endemics. *Curr Opin Infect Dis*. 2003; 16(4):315-25.
152. Paterson DL, Singh N, Rihs JD, Squier C, Rihs BL, Muder RR. Control of an outbreak of infection due to extended-spectrum beta-lactamase--producing *Escherichia coli* in a liver transplantation unit. *Clin Infect Dis*. 2001; 33(1):126-8.
153. Bjorkman J, Andersson DI. The cost of antibiotic resistance from a bacterial perspective. *Drug Resist Updat*. 2000; 3(4):237-245.
154. Levin BR. Minimizing potential resistance: a population dynamics view. *Clin Infect Dis*. 2001; 33 Suppl 3:S161-9.
155. Walther-Rasmussen J, Hoiby N. OXA-type carbapenemases. *J Antimicrob Chemother*. 2006; 57(3):373-83.
156. Poirel L, Naas T, Nordmann P. Diversity, epidemiology, and genetics of class D beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010; 54(1):24-38.
157. Aibinu IE, Pfeifer Y, Ogunsola F, Odugbemi T, Koenig W, Ghebremedhin B. Emergence of beta-lactamases OXA-10, VEB-1 and CMY in *Providencia spp.* from Nigeria. *J Antimicrob Chemother*. 2011; 66(8):1931-2.

158. Porto A, Ayala J, Gutkind G, Di Conza J. A novel OXA-10-like beta-lactamase is present in different Enterobacteriaceae. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2010; 66(2):228-9.
159. Acosta J, Merino M, Viedma E, Poza M, Sanz F, Otero JR, et al. Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* harboring OXA-24 carbapenemase, Spain. *Emerg Infect Dis*. 2011; 17(6):1064-7.
160. Fernandez A, Pereira MJ, Suarez JM, Poza M, Trevino M, Villalon P, et al. Emergence in Spain of a multidrug-resistant *Enterobacter cloacae* clinical isolate producing SFO-1 extended-spectrum beta-lactamase. *J Clin Microbiol*. 2011; 49(3):822-8.
161. Barnaud G, Arlet G, Verdet C, Gailliot O, Lagrange PH, Philippon A. *Salmonella enteritidis*: AmpC plasmid-mediated inducible beta-lactamase (DHA-1) with an *ampR* gene from *Morganella morganii*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1998;42(9):2352-8.
162. Fortineau N, Poirel L, Nordmann P. Plasmid-mediated and inducible cephalosporinase DHA-2 from *Klebsiella pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother*. 2001;47(2):207-10.
163. Nakano R, Okamoto R, Nakano Y, Kaneko K, Okitsu N, Hosaka Y, et al. CFE-1, a novel plasmid-encoded AmpC beta-lactamase with an *ampR* gene originating from *Citrobacter freundii*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004; 48(4):1151-8.
164. Reisbig MD, Hanson ND. The ACT-1 plasmid-encoded AmpC beta-lactamase is inducible: detection in a complex beta-lactamase background. *J Antimicrob Chemother*. 2002; 49(3):557-60.
165. Gallant CV, Daniels C, Leung JM, Ghosh AS, Young KD, Kotra LP, et al. Common beta-lactamases inhibit bacterial biofilm formation. *Mol Microbiol*. 2005; 58(4):1012-24.



## **7. ANEXOS**



## **7.1. Anexo I**



Journal of Antimicrobial Chemotherapy (2007) 59, 841–847  
doi:10.1093/jac/dkm030  
Advance Access publication 1 March 2007

JAC

## Interspecies spread of CTX-M-32 extended-spectrum $\beta$ -lactamase and the role of the insertion sequence IS1 in down-regulating *bla*<sub>CTX-M</sub> gene expression

Ana Fernández<sup>1</sup>, Emilia Gil<sup>2</sup>, Mónica Cartelle<sup>1</sup>, Astrid Pérez<sup>1</sup>, Alejandro Beceiro<sup>1</sup>, Susana Mallo<sup>1</sup>,  
María Mar Tomás<sup>1</sup>, Francisco J. Pérez-Llarena<sup>1</sup>, Rosa Villanueva<sup>1</sup> and Germán Bou<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Servicio de Microbiología-Unidad de Investigación, Complejo Hospitalario, Universitario Juan Canalejo, La Coruña, Spain; <sup>2</sup>Laboratorio de Microbiología, Hospital S. Rafael, La Coruña, Spain

Received 31 October 2006; returned 21 November 2006; revised 24 January 2007; accepted 24 January 2007

**Objectives:** To characterize the extended-spectrum  $\beta$ -lactamases (ESBLs) as well as their genetic environment in different isolates of Enterobacteriaceae from a patient with repeated urinary tract infections.

**Methods:** Two isolates of *Escherichia coli* and one *Proteus mirabilis*, all with ESBL phenotypes, were studied. Conjugation experiments and restriction fragment length polymorphisms (RFLPs) were performed. Cloning of the *bla* genes was by plasmid restriction and fragments ligation. Antibiotic susceptibility testing was by Etest. The genetic environment was analysed by direct sequencing of the DNA surrounding the *bla* gene. RT-PCR was performed to study the differences in the *bla*<sub>CTX-M</sub> gene expression.

**Results:** The *bla* gene was transferred by conjugation from the three clinical isolates, which by RFLP showed the same plasmid. The *bla* gene and surrounding sequences were cloned, an ~9 kbp *Acl* fragment was sequenced and the *bla*<sub>CTX-M-32</sub> gene was identified. The MICs of ceftazidime for transconjugants and transformants bearing the *bla*<sub>CTX-M-32</sub> gene were lower than those previously reported. Analysis of the DNA surrounding the ESBL gene revealed a new genetic structure with two insertion sequences, IS5 and IS1, located immediately upstream of the *bla*<sub>CTX-M-32</sub> gene; IS1 was located between the *bla* gene and IS5, and within the –10 and –35 promoter boxes of the *bla*<sub>CTX-M-32</sub> gene. Microbiological and biochemical studies revealed lower *bla*<sub>CTX-M-32</sub> gene expression in bacterial isolates with IS1 between the promoter boxes.

**Conclusions:** Data suggest putative *in vivo* horizontal *bla*<sub>CTX-M-32</sub> gene transfer between two different genera of Enterobacteriaceae. A new complex structure, IS5–IS1, was detected upstream of the *bla* gene and IS1 negatively modulated expression of the *bla*<sub>CTX-M-32</sub> gene because its location modified the *bla* promoter region.

**Keywords:** *In vivo* spreading, interspecies dissemination, ESBL expression

### Introduction

The production of  $\beta$ -lactamases is the predominant cause of resistance to  $\beta$ -lactam antibiotics in Gram-negative bacteria.<sup>1</sup> The  $\beta$ -lactamases are classified, according to the scheme of Ambler,<sup>2</sup> into four classes, designated A to D, on the basis of their amino acid sequences. Another classification scheme is that of Bush *et al.*,<sup>3</sup> in which representative  $\beta$ -lactamases belonging to all molecular classes are described with separation into

groups primarily on the basis of published functional characteristics. According to this classification scheme, class A extended-spectrum  $\beta$ -lactamases (ESBLs) are included in group 2b of the scheme of Bush *et al.*<sup>3</sup> They are mainly encoded by transferable plasmids, exhibit extended-spectrum activities, are capable of hydrolysing some broad-spectrum cephalosporins and are susceptible to clavulanic acid.

The CTX-M-type  $\beta$ -lactamases represent a rapidly emerging group with a typical phenotype of ESBL resistance, but are not

\*Corresponding author. Tel: +34-981-178359; Fax: +34-981-178216; E-mail: germanbou@canalejo.org

Fernández *et al.*

TEM or SHV derivatives.<sup>4</sup> The CTX-M  $\beta$ -lactamases are probably the most widespread ESBLs at present.<sup>4</sup> In the past few years, ESBLs of the CTX-M type have been increasingly reported in members of the family Enterobacteriaceae worldwide.<sup>4–12</sup>

Microbial drug resistance is an inescapable consequence of the use and overuse of antimicrobial agents in the treatment of patients.<sup>13</sup> This is one of the most obvious risk factors for the dissemination of genes encoding ESBLs. Nevertheless, the investigation of other factors may be critical for predicting the potential spread and evolution of ESBL-producing strains. For example, analysis of the genetic environment of ESBLs may help to explain the dissemination of ESBLs.<sup>14–17</sup> Different elements may be involved in the mobilization and expression of *bla*<sub>CTX-M</sub> genes.<sup>4,14–17</sup> Insertion sequences (ISs) are also an important source of genetic plasticity.

Another plasmid-borne *bla*<sub>CTX-M</sub>-type gene, *bla*<sub>CTX-M-32</sub>, was recently detected in an *Escherichia coli* isolate from La Coruña, Spain.<sup>18</sup> This gene, like *bla*<sub>CTX-M-15</sub>, *bla*<sub>CTX-M-16</sub>, *bla*<sub>CTX-M-19</sub> and *bla*<sub>CTX-M-27</sub>,<sup>19–22</sup> codes for an ESBL that has the ability to hydrolyse ceftazidime, and, therefore, strains of *E. coli* harbouring the gene are resistant to this antibiotic. The CTX-M-15, CTX-M-16 and CTX-M-27 as well as CTX-M-32 genes harbour an Asp-240→Gly substitution. *E. coli* expressing CTX-M-32 shows ceftazidime MICs higher than 256 mg/L.<sup>18</sup>

The present study describes intra- and interspecies transmission of the *bla*<sub>CTX-M-32</sub> gene as well as description of its genetic environment. In addition, the role of a specific IS in down-regulating *bla*<sub>CTX-M-32</sub> gene expression, and therefore in altering ceftazidime MICs, is also reported.

## Materials and methods

### Bacterial strains and susceptibility testing

An ESBL-producing strain of *E. coli* (EC1) was isolated from a patient admitted to the Juan Canalejo Hospital (La Coruña, Spain) with urinary tract infection (UTI) and who was previously treated with amoxicillin/clavulanic acid. Two months later, an ESBL-producing strain of *Proteus mirabilis* (PM1) was isolated from the same patient in a new episode of UTI. An ESBL-producing strain of *E. coli* (EC2) was isolated at the same time from the skin of the same patient. The bacteria were identified with API-20 E systems (bioMérieux SA, Marcy l'Étoile, France).

The MICs of the  $\beta$ -lactams amoxicillin, amoxicillin plus clavulanic acid, piperacillin, cefotaxime, cefotaxime plus clavulanic acid, ceftazidime, ceftazidime plus clavulanic acid, cefepime, aztreonam and imipenem were determined by Etest (AB Biodisk, Solna, Sweden), following the manufacturer's instructions. The ESBL phenotype was determined with the corresponding Etest strips; cefotaxime, ceftazidime and cefepime with clavulanic acid.

### DNA extraction

Bacterial chromosomal DNA was obtained with the MasterPure™ Genomic DNA Purification Kit Epicentre® (Biotechnologies, Madison, WI, USA) preparation kit. The purity and integrity of chromosomal DNA were checked by electrophoresis in 0.7% agarose gels in Tris/borate/EDTA (TBE) buffer prior to manipulation. Plasmid DNA was extracted from clinical strains, transconjugants and

transformants with the High Pure plasmid isolation kit (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany).

### Conjugation experiments, cloning experiments and DNA sequencing

Transfer of resistance by conjugation was attempted with *E. coli* XL1-Blue MRF<sup>+</sup> Kan strain (Stratagene Europe, Amsterdam, The Netherlands) as recipient. Overnight mating experiments were performed at 37°C, and the transconjugants TEC1, TEC2 and TPM1, obtained from EC1, EC2 and PM1, respectively, were selected on MacConkey agar plates supplemented with ampicillin (50 mg/L) and kanamycin (50 mg/L).

Cloning procedures were performed as described by Sambrook *et al.*<sup>23</sup> Restriction enzymes and T4 DNA ligase were purchased from Roche Diagnostics GmbH and were used as specified by the manufacturer.

For cloning the *bla* gene, plasmid DNA from transconjugant TPM1 was digested with *AccI*. The resulting fragments were ligated into pBGS18,<sup>24</sup> and the ligation mixture was transformed into *E. coli* TG1 [D(*lac-pro*) *supE* *thi* *hsdDS/F9* *traD36* *proA1B1* *lacZ* *lacZM15*] made competent by the calcium chloride method. After transformation, a few clones grew on Luria-Bertani (LB) agar plates supplemented with kanamycin (50 mg/L) and ampicillin (50 mg/L). These transformants harboured an identical plasmid (pAF-1) with an insert of ~9 kbp. Double-stranded templates were subjected to nucleotide sequencing by the method of Sanger *et al.*<sup>25</sup>

The BLAST program on the National Center for Biotechnology Information web site (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) was used for database searches.

### Repetitive extragenic palindromic (REP)-PCR

Amplification reactions were performed in a final volume of 50  $\mu$ L as previously reported.<sup>26</sup> The previously described primer pairs<sup>26</sup> were used to amplify putative REP-like elements in the genomic bacterial DNA.

### Plasmid restriction fragment length polymorphisms (RFLPs)

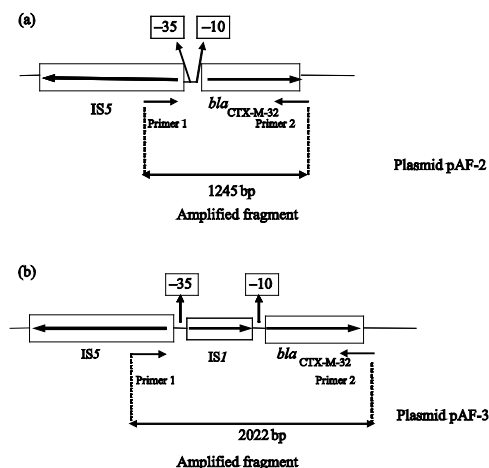
Plasmid DNA from *E. coli* XL1-Blue MRF<sup>+</sup> Kan transconjugants, TEC1, TEC2 and TPM1 was isolated. The DNA was then independently digested with *HindIII*, *HincII*, *BamHI* and *AccI* restriction enzymes, and the resulting fragments separated by electrophoresis on a 0.8% agarose gel. The DNA fragments were then visualized by staining with ethidium bromide (50 mg/L).

### Isoelectric focusing (IEF) assay and $\beta$ -lactamase detection

$\beta$ -Lactamases were characterized by IEF<sup>27</sup> of ultrasonicated bacterial extracts. Cultures of strains grown on LB medium were harvested and cell extracts were prepared by sonication. The  $\beta$ -lactamases were analysed by IEF of cell extracts on polyacrylamide gels containing ampholytes (range of pH 3–9) (PhastGel; Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA) in a PhastSystem apparatus (Amersham Pharmacia Biotech). The focused  $\beta$ -lactamases were detected by overlaying the gel with nitrocefin (0.5 mg/mL) in 100 mM phosphate buffer (pH 7.0).  $\beta$ -Lactamases with a known pI (CTX-M-8, 8.9; VIM-2, 5.1; and SHV-1, 7.6) were electrophoresed in parallel as controls.

For biochemical experiments to assess activity towards nitrocefin, protein extracts were obtained as described earlier for IEF

## Interspecies dissemination of CTX-M-32 ESBL



**Figure 1.** Schematic map of the region surrounding the *bla*<sub>CTX-M-32</sub> gene in (a) plasmid pMC-2<sup>18</sup> and (b) the plasmid reported in the present study. Recombinant plasmids pAF-2 and pAF-3 harboured 1245 and 2022 bp DNA fragments, respectively. Open reading frames and genes are shown as boxes with an arrow indicating the orientation of each coding sequence and the gene name is shown under the corresponding box. The relative location of promoter -35 and -10 boxes is indicated with respect to the *bla*<sub>CTX-M-32</sub> gene. Primers 1 and 2 (indicated by arrows) are those used to amplify the target region, which includes IS1 in plasmid pAF-3 (b).

assays, but with the presence of protease inhibitors aprotinin, pepstatin and leupeptin (20 mg/L final concentration each). Results were the mean value of three independent experiments.

#### Detection of ESBL genes by PCR

To confirm the presence of the *bla*<sub>CTX-M-32</sub> gene in the clinical isolates (EC1, EC2 and PM1) as well as their transconjugants (TEC1 and TEC2), a PCR assay was performed with CTX-M group 1 specific primers TestF (5'-ATGGTTAAAAATCACTGCG-3') and TestR (5'-TTACAAACCGTTGGTGAC-3'), using standard conditions. An amplicon band of 876 bp was considered as a positive result.

The products from TEC1 and TEC2 were sequenced to confirm the precise *bla*<sub>CTX-M-32</sub> gene.

#### Promoter analysis of the *bla*<sub>CTX-M-32</sub> gene

To confirm the functionality of the *bla*<sub>CTX-M-32</sub> promoter and the role of the IS1 insertion in separating -35 and -10 regions and, therefore, in reducing *bla* gene expression, a set of experiments was performed with the *bla*<sub>CTX-M-32</sub> gene as gene reporter. For this, a PCR assay was carried out with the oligonucleotides Primer1 (5'-AAAGGATCCGCTGAATTCATCTATCGGCG) and Primer2 (5'-AAAGAATTCCTGTTCCGCTATTACAAAC), which amplify a DNA region including promoter and the whole *bla*<sub>CTX-M-32</sub> gene. Plasmid pMC-2<sup>18</sup> (Figure 1), which harbours the originally described *bla*<sub>CTX-M-32</sub> gene, and plasmid pAF-1 reported here were used as templates. Amplicons from pMC-2 and pAF-1 (1245 and 2022 bp,

respectively) were then digested with *Bam*HI and *Eco*RI, ligated into pBGS18, transformed into *E. coli* TG1 and the transformants were selected on LB plates with 50 mg/L kanamycin and 50 mg/L ampicillin. The resulting recombinant plasmids, containing amplicons from pMC-2 and pAF-1, were designated as pAF-2 and pAF-3, respectively (Figure 1). The MICs of  $\beta$ -lactams for *E. coli* TG1 harbouring pAF-2 and pAF-3 were determined, as was the specific activity towards 100  $\mu$ M nitrocefin with protein extracts from these transformants.

Real-time RT-PCR was also performed to determine the expression of the *bla*<sub>CTX-M-32</sub> gene. Total RNA was isolated using TRIZOL<sup>®</sup> Reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions and treated with RNase-free DNase I. The concentration of RNA was determined spectrophotometrically and 1  $\mu$ g of RNA was reverse transcribed into single-stranded cDNA using a Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche Diagnostics GmbH), according to the manufacturer's instructions. The cDNAs were quantified by real-time PCR amplification with specific primers (CTX-M-32-F 5'-TATAATCCGATTGCGGAAAAG and CTX-M-32-R 5'-CGGTACGTCGAGACGGAA, GapA-F 5'-GTCCGTCA-AAGACAACACTCCG and GapA-R 5'-CGATGATGCCGAAGT-TATCG) using the Light Cycler<sup>®</sup> 480 (Roche Diagnostics GmbH), with initial incubation at 95°C for 10 min, followed by 45 cycles of 10 s at 95°C, 10 s at 60°C and 10 s at 72°C. The expression levels were normalized against the *gapA* housekeeping gene (coding for glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase A).

## Results

### Antimicrobial susceptibilities

The antibiotic susceptibility profiles of *E. coli* isolates EC1 and EC2 and *P. mirabilis* isolate PM1 and of their ESBL-producing transconjugants showed resistance to most of the  $\beta$ -lactam antibiotics tested, with the exception of  $\beta$ -lactam/ $\beta$ -lactamase inhibitor combinations and imipenem (Table 1). A moderate degree of resistance to ceftazidime, aztreonam and cefepime was also observed. For these bacterial strains, the MIC of cefotaxime was higher than that of ceftazidime, suggesting the presence of a CTX-M-type enzyme.

### Detection of the CTX-32 ESBL gene in TEC1, TEC2 and TPM1

A *bla* gene was detected by PCR with specific oligonucleotides of group 1 CTX-M enzymes, in clinical strains EC1, EC2 and PM1, as well as with their transconjugants TEC1, TEC2 and TPM1. Sequencing of the amplicons obtained from TEC1, TEC2 and TPM1 revealed the presence of the *bla*<sub>CTX-M-32</sub> gene in all cases. IEF showed that all three clinical strains and their transconjugants had a unique major  $\beta$ -lactamase band of pI 9.0, corresponding to CTX-M-32 enzyme.

### REP-PCR

A REP-PCR assay was carried out to discount any epidemiological relationship between clinical *E. coli* strains EC1 and EC2. More than two band differences were detected between EC1 and EC2, therefore suggesting that there was no genetic relationship between them (data not shown).

Fernández et al.

Table 1. MICs of  $\beta$ -lactam antibiotics (mg/L) for the bacterial isolates under study

Antibiotics	<i>E. coli</i> EC1	<i>E. coli</i> EC2	<i>P. mirabilis</i> PM1	<i>E. coli</i> TBC1 <sup>c</sup>	<i>E. coli</i> TBC2 <sup>c</sup>	<i>E. coli</i> TPM1 <sup>c</sup>	<i>E. coli</i>			<i>E. coli</i> TG1	<i>E. coli</i> XL1-Blue <sup>o</sup>
							TG1 <sup>a</sup> (pAF-1)	TG1 <sup>a,b</sup> (pAF-2)	TG1 <sup>a,b</sup> (pAF-3)		
AMX	>256	>256	>256	>256	>256	>256	>256	>256	>256	3	4
AMX/CLA	8	8	4	16	4	8	8	4	8	4	4
PIP	>256	>256	>256	>256	>256	>256	>256	>256	>256	0.38	0.38
CTX	>256	>256	>256	>256	>256	>256	>256	>256	>256	0.02	0.02
CTX/CLA	0.12	0.06	0.03	0.06	0.06	0.12	0.12	0.12	0.12	0.02	0.02
CAZ	8	8	8	16	8	8	32	>256	4	0.06	0.06
CAZ/CLA	0.25	0.25	0.06	0.5	0.25	0.5	0.12	0.12	0.12	0.06	0.06
ATM	32	16	8	32	32	32	32	>256	8	0.03	0.03
FEP	8	8	8	4	8	8	16	>256	4	0.03	0.02
IPM	0.25	0.25	2	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.12	0.12

AMX, amoxicillin; CLA, clavulanic acid; PIP, piperacillin; CTX, cefotaxime; CAZ, ceftazidime; ATM, aztreonam; FEP, cefepime; IPM, imipenem.

<sup>a</sup>*E. coli* TG1 transformed with the indicated plasmids.<sup>b</sup>Identical MIC values were obtained with three independent transformants.<sup>c</sup>TEC1, transconjugant from EC1; TEC2, transconjugant from EC2; TPM1, transconjugant from PM1; XL1-Blue, transconjugant strain.

## RFLP analysis of ESBL-encoding plasmids

As the *bla*<sub>CTX-M-32</sub> gene was demonstrated to be encoded by conjugative plasmids in the clinical strains of *E. coli* (EC1 and EC2) and *P. mirabilis* (PM1), an attempt was then made to assess whether or not these plasmids were genetically related, thus raising the possibility of intra- and interspecies transmission in the patient.

The restriction patterns with *Bam*HI, *Acc*I, *Hind*III or *Hinc*II of the three plasmids obtained from transconjugants TEC1, TEC2 and TPM1 were very similar (data not shown), which provides strong evidence that the same plasmid (~20 kbp) was present in different strains of Enterobacteriaceae isolated from the same patient.

## Identification of the genetic structures surrounding the CTX-M-32 ESBL gene

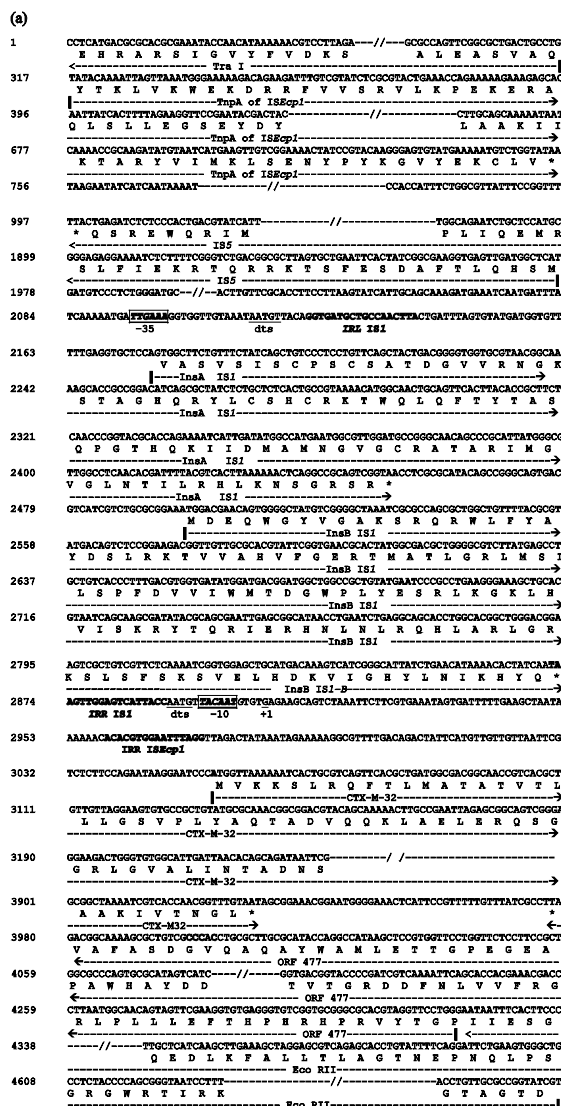
As several ESBL genes may be transposon- or integron-borne,<sup>14-17</sup> the surrounding sequences of the *bla*<sub>CTX-M-32</sub> gene were explored to detect any potential genetic structures able to mobilize the ESBL gene. For this, the *Acc*I fragment of ~9 kbp cloned from TPM1 (pAF-1 plasmid) was used as template for nucleotide sequencing of the surrounding region of the *bla*<sub>CTX-M-32</sub> gene. The full sequence of ~5 kbp is shown in Figure 2.

There are some interesting features worthy of mention: as previously reported<sup>18</sup> the inverted repeat right (IRR) sequence of *ISEcpIB* was detected 80 bp upstream of the ATG start codon of *bla*<sub>CTX-M-32</sub> (Figure 2); in this fragment, the -35 and -10 promoter sequences provided by this IRR were physically separated and therefore modified by the presence of the IS *IS1*<sup>24</sup> (Figure 2a and b); *IS1* was bracketed by a 5 bp duplicated target site of the putative insertion site for the DNA fragment resulting from an *IS1*-mediated transposition process. *IS1* also contained two imperfect 18 bp inverted-repeat sequences (four mismatches), inverted repeat left (IRL) (left) and IRR (right) surrounding an *InsA*-*InsB* protein that encoded a putative transposase, the integrity of which is essential for transposition;<sup>28,29</sup> no putative promoter sequences were found in the 80 bp sequence that separated the IRR of *ISEcpIB* from the ATG site of the *bla*<sub>CTX-M-32</sub> gene. Our research team<sup>18</sup> and others<sup>17</sup> have previously demonstrated that this IRR provided -35 and -10 promoter sequences for the expression of *bla*<sub>CTX-M</sub> genes. However, in the bacterial strains under study, the IS *IS1* is located between the -10 and -35 promoter sequences, and it is therefore plausible that this genetic event is responsible for the reduced *bla*<sub>CTX-M-32</sub> gene expression. This hypothesis is supported by the fact that MICs of ceftazidime were lower than for previously reported bacterial strains bearing *bla*<sub>CTX-M-32</sub> (>256 mg/L when compared with 8-32 mg/L for the strains reported here); the *IS1* was downstream of a *tnpA* gene that encoded the transposase of *IS5*, which we have previously reported to be associated with *bla*<sub>CTX-M-32</sub>;<sup>18</sup> a truncated ORF-477 was found downstream of the *bla*<sub>CTX-M-32</sub> gene.

To confirm that *IS1* was interrupting the -10 and -35 regions of the *bla*<sub>CTX-M-32</sub> promoter and therefore modulating *bla*<sub>CTX-M-32</sub> gene expression, the MICs were determined for *E. coli* TG1 harbouring pAF-2 and pAF-3 (Figure 1). The MICs of ceftazidime for pAF-2 and pAF-3 transformants were >256 and 4 mg/L, respectively (Table 1). The MICs of aztreonam and



## Interspecies dissemination of CTX-M-32 ESBL



**Figure 2.** (a) Nucleotide sequence of ~5 kbp DNA fragment of pAF-1 plasmid. The deduced amino acid sequence is indicated by single-letter code below the nucleotide sequence. Stop codons are indicated by asterisks. The -35 and -10 promoter sequences of the *bla*<sub>CTX-M-32</sub> gene are boxed and indicated by bold letters, and the +1 position of the transcriptional start of the *bla*<sub>CTX-M-32</sub> gene (determined on the basis of that described for *bla*<sub>CTX-M-15</sub>) is also indicated. The IRR sequence of *ISEcpI* and the IRL and IRR of *IS1* are also indicated in bold type. The 5 bp duplicated target sites of the putative insertion site for the DNA fragment resulting from an *IS1*-mediated transposition process are underlined and indicated as dts. Different gene products are indicated below the amino acid sequence where appropriate. (b) Schematic map of the genetic environment surrounding the *bla*<sub>CTX-M-32</sub> gene. Open reading frames and genes are shown as boxes with an arrow indicating the orientation of each coding sequence and the gene name shown over the corresponding box. IRL and IRR motifs of *IS1* are indicated by vertical arrows. IRR of *ISEcpI* is also indicated by a vertical arrow (irr). The promoter boxes of *bla*<sub>CTX-M-32</sub> are indicated as P(-10) and P(-35). t, truncated proteins. Horizontal arrows below indicate oligonucleotides used for sequencing of nucleotides.

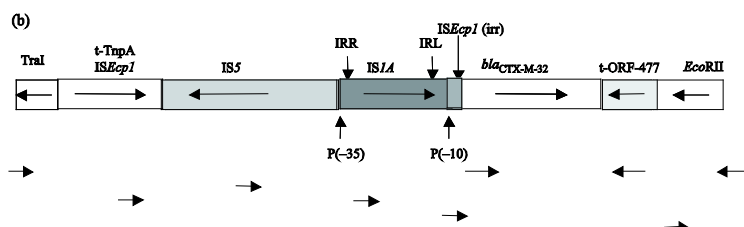
Fernández *et al.*

Figure 2. Continued.

cefepime for pAF-3 transformants were also lower. Moreover, specific activity towards nitrocefin was  $1.9 \pm 0.05 \times 10^{-4}$  and  $8.9 \pm 2.2 \times 10^{-6}$   $\mu\text{mol/s} \cdot \mu\text{g}$  of protein with cell extract from transformants pAF-2 and pAF-3, respectively. There were no differences between pAF-2 and pAF-3 plasmids in terms of the sequence of nucleotides in *bla*<sub>CTX-M-32</sub> or additional regulatory sequences (data not shown). RT-PCR analysis showed  $\geq 10$  times higher expression of *bla*<sub>CTX-M-32</sub> in *E. coli* TG1 expressing the *bla* gene with its intact promoter (pAF-2 plasmid) with respect to that with *IS1* modifying the promoter region (pAF-3 plasmid).

These results were further supported by cloning the *bla*<sub>CTX-M-32</sub> gene under the control of the previously described CTX-M-14 gene promoter (positions 1502–1740 of the sequence with EMBL database accession no. AF252622, which have been demonstrated to drive high levels of gene transcription) into pBGS18 to obtain full ESBL expression. After transformation of different clones harbouring *bla*<sub>CTX-M-32</sub> under the CTX-M-14 gene promoter into *E. coli* TG1, the resulting MICs of ceftazidime were  $>256$  mg/L (data not shown).

## Discussion

We report the identification of the *bla*<sub>CTX-M-32</sub> gene in two different Enterobacteriaceae species (*E. coli* and *P. mirabilis*) as well as in a genetically unrelated strain of *E. coli* isolated from the same patient. The patient had a history of recurrent UTIs and kidney stones, which may have favoured *in vivo* transmission of the plasmid harbouring the *bla*<sub>CTX-M-32</sub> gene between *E. coli* and *P. mirabilis*. The presence of bacteria within the stones suggests that the infecting bacteria play a major role in the structure of the stones. Growth of biofilm may provide organisms with survival advantages and increase their virulence as well as facilitating horizontal gene transfer (i.e. ESBL).<sup>30,31</sup>

There are few examples showing putative *in vivo* transmission of ESBL genes. Mugnaioli *et al.*<sup>32</sup> reported a putative *in vivo* transmission of CTX-M-1 between *E. coli* and *Citrobacter amalonaticus* and *Morganella morganii*, which highlights the ability of CTX-M-type ESBL genes to spread among different species of Enterobacteriaceae.

Analysis of the surrounding sequence of *bla*<sub>CTX-M-32</sub> in the clinical strains under study revealed different ISs. The first was a partially truncated fragment of *ISEcp1 tnpA* transposase. The next IS found was the complete *IS5*, which has previously been detected upstream of *bla*<sub>CTX-M-32</sub>.<sup>18</sup> The *IS1* IS was found between the *IS5* and *bla*<sub>CTX-M-32</sub> and it appeared to be complete,

with all elements required for its function. The *IS1* IS has also previously been detected upstream of the *bla*<sub>CTX-M</sub> genes and found to disrupt the *ISEcp1* element.<sup>14</sup> The ISs, such as *IS1*, are an important source of genetic plasticity in prokaryotes.<sup>28,29</sup> This is the first description of the presence of ISs *ISEcp1* (truncated), *IS5* and *IS1* together in the same plasmid, upstream of a *bla*<sub>CTX-M</sub> gene. A 281 bp sequence was detected downstream of the *bla* gene and corresponded to a truncated part of ORF-477, which has previously been found in genetic structures surrounding plasmid-borne *bla*<sub>CTX-M</sub> genes in bacterial clinical isolates and described downstream of the *bla*<sub>CTX-M-3</sub> gene of *Kluyvera ascorbata*.<sup>4,14</sup>

The MICs of ceftazidime for transconjugants and transformants harbouring *bla*<sub>CTX-M-32</sub> were not as high as those expected for the CTX-M-32 enzyme,<sup>18</sup> which has been attributed to resistance resulting from ceftazidime hydrolysis.<sup>4,18</sup> A detailed analysis of the upstream sequence surrounding the *bla*<sub>CTX-M-32</sub> genes reported here showed that the *IS1* was located between the –35 and –10 promoter boxes, thereby separating and breaking the functionality of the *bla*<sub>CTX-M-32</sub> promoter region,<sup>18</sup> results that were further confirmed in this work. Indeed, the ratio of the relative specific activity against nitrocefin of protein extracts from pAF-2 and pAF-3 transformants (that expressed the originally reported *bla*<sub>CTX-M-32</sub> promoter and that *IS1* truncated, respectively) was  $\geq 20$  times higher, which may account for differences in  $\beta$ -lactamase expression, and therefore in the MICs of ceftazidime and other broad-spectrum  $\beta$ -lactams. Therefore, as well as contributing to high-level expression of *bla* genes, e.g. *bla*<sub>CTX-M-19</sub><sup>17</sup> and also *bla*<sub>CTX-M-32</sub>,<sup>18</sup> ISs may also reduce or eliminate  $\beta$ -lactamase gene expression by interrupting a specific promoter region.<sup>33</sup>

In summary, putative transmission of a plasmid carrying *bla*<sub>CTX-M-32</sub> between two different genera of Enterobacteriaceae is described in a patient who suffered from repeated UTI. Analysis of the DNA sequence surrounding this *bla*<sub>CTX-M-32</sub> gene revealed a new composite structure formed by *ISEcp1*, *IS5* and *IS1*. The *IS1* element was inserted within the promoter region of *bla*<sub>CTX-M-32</sub>, thereby reducing ESBL production, modulating antibiotic resistance and resulting in low ceftazidime MICs. These structures may complicate the detection of these ceftazidime-hydrolysing CTX-M-type enzymes.

## Nucleotide sequence accession number

The GenBank accession number for the nucleotide sequence reported here is AM420303.

## Interspecies dissemination of CTX-M-32 ESBL

## Acknowledgements

We thank Dr Martínez-Beltrán for critical reading and Christine Francis for correction of the English style and grammar of the text. A. B. and M. C. are in receipt of a scholarship from SEIMC. M. M. T. is in receipt of a post-MIR research contract from the Instituto de Salud Carlos III. The study was partly financed by the Consellería de Innovación, Industria y Comercio, Xunta de Galicia (PGDIT04BTF916028PR), Fondo de Investigaciones Sanitarias (PI040514 and PI061368) and also supported by Ministerio de Sanidad y Consumo, ISCIII, Spanish Network for the Research in Infectious Diseases (REIPI RD06/0008).

## Transparency declarations

None to declare.

## References

- Bradford PA. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clin Microbiol Rev* 2001; 14: 933–51.
- Ambler RP. The structure of  $\beta$ -lactamases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 1980; 289: 321–31.
- Bush K, Jacoby GA, Meldreiros AA. A functional classification scheme for  $\beta$ -lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39: 1211–33.
- Bonnet R. Minireview: growing group of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases: the CTX-M enzymes. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48: 1–14.
- Chanawong A, M'Zali FH, Heritage J *et al*. Three cefotaximases, CTX-M-9, CTX-M-13, and CTX-M-14, among *Enterobacteriaceae* in the People's Republic of China. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46: 630–7.
- Hoffmann H, Stürenburg E, Heesemann J *et al*. Prevalence of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in isolates of the *Enterobacter cloacae* complex from German hospitals. *Clin Microbiol Infect* 2006; 12: 322–30.
- Chmelinsky I, Carmell Y, Leavitt A *et al*. CTX-M-2 and a new CTX-M-39 enzyme are the major extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in multiple *Escherichia coli* clones isolated in Tel Aviv, Israel. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49: 4745–50.
- Bou G, Cartelle M, Tomás M *et al*. Identification and broad dissemination of the CTX-M-14  $\beta$ -lactamase in different *Escherichia coli* strains in the northwest area of Spain. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 4030–6.
- Hernández JR, Martínez-Martínez L, Cantón R *et al*. Nationwide study of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in Spain. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49: 2122–5.
- Gangoue-Pieboji J, Miliagou V, Vourli S *et al*. Emergence of CTX-M-15-producing enterobacteria in Cameroon and characterization of a *bla*<sub>CTX-M-15</sub>-carrying element. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49: 441–3.
- Sabate M, Tarrago R, Navarro F *et al*. Cloning and sequence of the gene encoding a novel cefotaxime-hydrolyzing  $\beta$ -lactamase (CTX-M-9) from *Escherichia coli* in Spain. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44: 1970–3.
- Eckert C, Gautier V, Saladin-Allard M *et al*. Dissemination of CTX-M-type  $\beta$ -lactamases among clinical isolates of *Enterobacteriaceae* in Paris, France. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48: 1249–55.
- Sanders CC, Sanders WE.  $\beta$ -Lactam resistance in Gram-negative bacteria: global trends and clinical impact. *Clin Infect Dis* 1992; 15: 824–39.
- Eckert C, Gautier V, Arlet G. DNA sequence analysis of the genetic environment of various *bla*<sub>CTX-M</sub> genes. *J Antimicrob Chemother* 2006; 57: 14–23.
- Lartigue MF, Poirel L, Nordmann P. Diversity of genetic environment of *bla*<sub>CTX-M</sub> genes. *FEMS Microbiol Lett* 2004; 234: 201–7.
- Saladin M, Bao Cao VT, Lambert T *et al*. Diversity of CTX-M  $\beta$ -lactamases and their promoter regions from *Enterobacteriaceae* isolated in three Parisian hospitals. *FEMS Microbiol Lett* 2002; 209: 161–8.
- Poirel L, Decousser JW, Nordmann P. Insertion sequence *ISEcp1B* is involved in expression and mobilization of a *bla*<sub>CTX-M</sub>  $\beta$ -lactamase gene. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47: 2938–45.
- Cartelle M, Tomás MM, Molina F *et al*. High-level resistance to ceftazidime conferred by a novel enzyme, CTX-M-32, derived from CTX-M-1 through a single Asp240-Gly substitution. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48: 2308–13.
- Karim A, Poirel L, Nagarajan S *et al*. Plasmid-mediated extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (CTX-M-3 like) from India and gene association with insertion sequence *ISEcp1*. *FEMS Microbiol Lett* 2001; 201: 237–41.
- Bonnet R, Dutour C, Sampalo JLM *et al*. Novel cefotaxime (CTX-M-16) with increased catalytic efficiency due to substitution Asp-240  $\rightarrow$  Gly. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45: 2269–75.
- Poirel L, Naas T, Le Thomas I *et al*. CTX-M-type extended-spectrum  $\beta$ -lactamase that hydrolyzes ceftazidime through a single amino acid substitution in the omega loop. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45: 3355–61.
- Bonnet R, Recule C, Baraduc R *et al*. Effect of D240G substitution in a novel ESBL CTX-M-27. *J Antimicrob Chemother* 2002; 52: 29–35.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Second Edition. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- Spratt B, Hedge PJ, Te Heesen S *et al*. Kanamycin-resistant vectors that are analogues of plasmids pUC8, pUC9, pEMBL8 and pEMBL9. *Gene* 1986; 41: 337–42.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977; 74: 5463–7.
- Bou G, Cerveró G, Domínguez MA *et al*. PCR-based DNA fingerprinting (REP-PCR, AP-PCR) and pulsed-field gel electrophoresis characterization of a nosocomial outbreak caused by imipenem- and meropenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Clin Microb Infect* 2000; 6: 635–43.
- Mathew M, Harris A, Marshall MJ *et al*. The use of analytical isoelectric focusing for detection and identification of  $\beta$ -lactamases. *J Gen Microbiol* 1975; 88: 169–78.
- Sekino N, Sekine Y, Ohtsubo E. IS1-encoded proteins, InsA and the InsA-B'-InsB transframe protein (transposase): functions deduced from their DNA-binding ability. *Adv Biophys* 1995; 31: 209–22.
- Machida Y, Machida C, Ohtsubo E. Insertion element IS1 encodes two structural genes required for its transposition. *J Mol Biol* 1984; 177: 229–45.
- McLean RJ, Curtis Nickel J, Noakes VC *et al*. An *in vitro* ultrastructural study of infectious kidney stoneogenesis. *Infect Immun* 1985; 49: 805–11.
- Parsek MR, Singh PK. Bacterial biofilms: an emerging link to disease pathogenesis. *Ann Rev Microbiol* 2003; 57: 677–701.
- Mugnalioli C, Luzzaro F, De Luca F *et al*. Dissemination of CTX-M-type extended-spectrum  $\beta$ -lactamase genes to unusual hosts. *J Clin Microb* 2005; 43: 4183–5.
- Woodford N, Ward ME, Kaufmann ME *et al*. Community and hospital spread of *Escherichia coli* producing CTX-M extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in the UK. *J Antimicrob Chemother* 2004; 54: 735–43.



## **7.2. Anexo II**



## Emergence in Spain of a Multidrug-Resistant *Enterobacter cloacae* Clinical Isolate Producing SFO-1 Extended-Spectrum $\beta$ -Lactamase<sup>V</sup>

Ana Fernández,<sup>1</sup> Mar a José Pereira,<sup>2</sup> José Manuel Suárez,<sup>2</sup> Margarita Poza,<sup>1</sup> Mercedes Treviño,<sup>3</sup> Pilar Villalón,<sup>4</sup> Juan Antonio Sáez-Nieto,<sup>4</sup> Benito José Regueiro,<sup>3</sup> Rosa Villanueva,<sup>1</sup> and Germán Bou<sup>1\*</sup>

Servicio de Microbiología,<sup>1</sup> and Servicio de Medicina Preventiva,<sup>2</sup> Complejo Hospitalario Universitario A Coruña, A Coruña, Spain; Servicio de Microbiología, Complejo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, Spain<sup>3</sup>; and Centro Nacional de Microbiología, Majadahonda, Madrid, Spain<sup>4</sup>

Received 14 September 2010/Returned for modification 23 October 2010/Accepted 3 January 2011

Between February 2006 and October 2009, 38 patients in different wards at the A Coruña University Hospital (northwest Spain) were either infected with or colonized by an epidemic, multidrug-resistant (MDR), and extended-spectrum- $\beta$ -lactamase (ESBL)-producing strain of *Enterobacter cloacae* (EbSF), which was susceptible only to carbapenems. Semiautomated repetitive extragenic palindromic sequence-based PCR (rep-PCR) and pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) analysis revealed that all of the *E. cloacae* isolates belonged to the same clone. Cloning and sequencing enabled the detection of the SFO-1 ESBL in the epidemic strain and the description of its genetic environment. The presence of the *ampR* gene was detected upstream of *bla*<sub>SFO-1</sub>, and two complete sequences of IS26 surrounding *ampR* and *ampA* were detected. These IS26 sequences are bordered by complete left and right inverted repeats (IRL and IRR, respectively), which suggested that they were functional. The whole segment flanked by two IS26 copies may be considered a putative large composite transposon. A gene coding for aminoglycoside acetyltransferase (gentamicin resistance gene [*aac3*]) was found downstream of the 3' IS26. Despite the implementation of strict infection control measures, strain EbSF spread through different areas of the hospital. A case-control study was performed to assess risk factors for EbSF acquisition. A multivariate analysis revealed that the prior administration of  $\beta$ -lactam antibiotics, chronic renal failure, tracheostomy, and prior hospitalization were statistically associated with SFO-1-producing *E. cloacae* acquisition. This study describes for the first time an outbreak in which an SFO-1-producing *E. cloacae* strain was involved. Note that so far, this  $\beta$ -lactamase has previously been isolated in only a single case of *E. cloacae* infection in Japan.

Antimicrobial resistance is a serious problem that affects patients in hospitals worldwide. The production of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases (ESBLs) among members of the *Enterobacteriaceae* has become one of the most difficult clinical problems in relation to therapeutics and epidemiology (35). ESBLs are plasmid-encoded enzymes that are able to hydrolyze a wide variety of penicillins and cephalosporins (1). These plasmids often carry genes for resistance to other types of antibiotics and code for multidrug resistance phenotypes for which treatment options are limited.

*Enterobacter cloacae* is an emerging clinical pathogen (36) that causes mainly nosocomial infections in critical patients. The detection of ESBLs in *Enterobacter* spp. is a problem for clinical microbiology laboratories because the main mechanism of resistance is the overproduction of the chromosomal AmpC  $\beta$ -lactamase (13), which may be hiding the expression of ESBL. Microbiology laboratories should be aware of the advent of ESBLs in AmpC-producing *E. cloacae* strains and of their potential clinical importance (31).

Large outbreaks caused by ESBL-producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* strains have been described world-

wide (3–5, 24, 26, 43, 44); however, few outbreaks have been reported to be caused by ESBL-producing *E. cloacae* strains (14, 15, 20, 27, 29). To date, only one outbreak has been described in Spain (20), between July and September 2005, involving seven patients admitted to a cardiothoracic intensive care unit (ICU).

In 2006, a multidrug-resistant (MDR) ESBL-producing *E. cloacae* strain (EbSF), susceptible only to carbapenems, emerged in the A Coruña University Hospital.

We performed the present study with the aim of analyzing the molecular basis for antibiotic resistance as well as the clinical and molecular epidemiology of ESBL-producing *E. cloacae*. Furthermore, the risk factors for the acquisition of the epidemic strain and clinical and microbiology factors were also considered.

### MATERIALS AND METHODS

**Study site, subjects, and variables.** This study was conducted at the A Coruña University Hospital, a 1,200-bed tertiary-level hospital serving a population of 516,000 in northwest Spain. Between February 2006 and October 2009, 38 patients were either infected with or colonized by an epidemic strain called EbSF. For every case patient, EbSF was detected in clinical samples that were taken with the objective to diagnose or exclude an infection.

Study variables included the type of sample from which EbSF was isolated, microbiological cultures used for monitoring of patients, and the type of presentation (infection or colonization). Nosocomial acquisition of infection was defined as an infection that occurred >48 h after admission to the hospital or an infection that occurred <48 h after admission to the hospital if the patient had

\* Corresponding author. Mailing address: Laboratorio de Microbiología, Complejo Hospitalario Universitario A Coruña-INIBIC, Xubias s/n 3ª Planta Ed Sur, 15006 A Coruña, Spain. Phone: 34-981 176087. Fax: 34-981 176097. E-mail: German.Bou.Arevalo@sergas.es.

<sup>V</sup> Published ahead of print on 12 January 2011.

been hospitalized within the 30 days before admission (12). The criteria for infection were defined in accordance with criteria of the Centers for Disease Control and Prevention (8). Patients who did not meet the criteria for infection were considered to be colonized.

A case-control study was performed to define the risk factors for the acquisition of the ESBL-producing *E. cloacae* strain. The 24 patients infected with or colonized by EbSF, which had been isolated from clinical samples during 2006 and 2007, were designated cases. The control group included three controls per case patient and per unit. The admission period was at least 2 days and up to 15 days prior to the first isolation of EbSF. The control group consisted of 80 patients, because 3 of the case patients were admitted in two different wards in the previous 15 days of isolation, and in 1 case we could obtain only 2 controls with the inclusion criteria. We did not consider whether the controls had infection criteria, but no ESBL-producing *E. cloacae* was isolated from any of the control subjects.

A retrospective review of the 24 patients was conducted, and data were recorded. The variables reviewed included demographic characteristics (age and gender), severity of underlying conditions (as indicated by the Charlson comorbidity score [23]), and underlying diseases (gastrointestinal tract disease, diabetes mellitus, solid tumor, cardiovascular disease, chronic pulmonary disease, chronic renal failure, transplantation, and immunodeficiency). Data for the following extrinsic factors were collected for the 30-day period prior to isolation during hospitalization: prior surgery, hospitalization in an intensive care unit, invasive procedures, prior hospitalization (2 years before), and prior antibiotic therapy (defined as antibiotics given for at least 2 days within the 30 days preceding the isolation of the organism). Antibiotic data were grouped into antimicrobial classes for statistical analysis. All case patients were observed until hospital discharge or death.

**Control measures taken.** The patients were isolated in single rooms (whenever possible), and standard and contact isolation precautions were strengthened. Contact isolation was stopped when there were three consecutive negative screening cultures (usually rectal swabs and surgical wound cultures if there was one). The screening cultures were performed every 48 h. The roommates were also screened (usually rectal swabs), but these patients were not included in our study, although some of them had positive cultures.

There was an active surveillance program for the detection of ESBL in strains of the *Enterobacteriaceae* in the hospital before 2006, when EbSF was detected. No *E. cloacae* cases with isolates belonging to the outbreak genotype were detected before February 2006.

**Statistical analysis.** The data were stored and analyzed by using SPSS software, version 15.0 (SPSS Inc., Chicago, IL). The statistical analysis was restricted to cases reported between 2006 and 2007. A univariate analysis was carried out for the determination of variables significantly associated with colonization or infection by EbSF. Quantitative variable differences between case and control patients were compared by using the Student *t* test. Qualitative variables were analyzed by a chi-square test or Fisher's exact test. A multiple-regression logistic model was developed to identify the potential independent factors associated with colonization and/or infection by EbSF. The multivariate analysis included all variables with a *P* value of <0.1 in the univariate analysis, and we followed a forward stepwise strategy. Ninety-five-percent confidence intervals (CIs) were calculated as estimators. The results were considered statistically significant at a *P* value of <0.05.

**Bacterial isolates and susceptibility assays.** A total of 38 clinical ESBL-producing *E. cloacae* strains isolated from 38 patients admitted to the A Coruña University Hospital (Spain) were studied (Table 1). Bacterial identification was performed with a Micro Scan WalkAway instrument (Siemens HealthCare Diagnostics Inc.) according to the manufacturer's instructions. MICs of several antibiotics (Table 2) were determined by Etest (AB Biodisk, Solna, Sweden). Results were interpreted according to the manufacturer's instructions.

The strains were grown on MacConkey agar plates (BD, NJ) or Luria-Bertani (LB) broth and agar when required. *Escherichia coli* strain TGI was used for cloning procedures.

**Molecular typing.** (i) **PFGE.** For pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) analysis, genomic DNA from *E. cloacae* was digested with XbaI (Promega Corporation, Madison, WI) according to standard procedures (10) and the interpretation criteria described previously by Tenover (38). *Salmonella enterica* serovar Braenderup and a non-ESBL-producing *E. cloacae* strain were used as controls.

(ii) **DiversiLab microbial typing system.** The DiversiLab *Enterobacter* DNA fingerprinting kit (bioMérieux, France) was used for repetitive extragenic palindromic sequence-based PCR (rep-PCR) amplification of noncoding intergenic repetitive elements in the genomic DNA of 36 *E. cloacae* strains according to the manufacturer's instructions. The amplicons were analyzed with DiversiLab analysis software (bioMérieux, France) as previously described (39).

*E. cloacae* ATCC 13847 and two epidemiologically unrelated *E. cloacae* isolates were included as nonrelated strain controls. The strains were typed in duplicate, with consistent reproducibility.

**$\beta$ -Lactamase characterization.** A preliminary characterization of  $\beta$ -lactamases and their genes was performed by isoelectric focusing (IEF) (21) and PCR assays, respectively. PCRs were performed for families of ESBLs commonly isolated in the hospital (CTX-M group 1, CTX-M group 9, and SHV-12). The primers are described in Table 3. Since no amplicon was obtained, characterization of the  $\beta$ -lactamase gene was performed by cloning procedures.

**Cloning procedures.** Cloning experiments and nucleotide sequencing were done as previously reported (6).

The plasmidic constructions were sequenced in order to analyze the *bla* genes and their genetic environments.

The BLAST program at the National Center for Biotechnology Information website (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) was used to identify the sequences.

**Nucleotide sequence accession number.** The nucleotide sequence data for the partial insert of the TGI-pAF2 clone were submitted to the GenBank nucleotide sequence database and assigned accession number FJ848785.

## RESULTS

**Descriptive clinical study.** During the study period, EbSF was isolated from clinical samples from 38 different patients. Some clinical and epidemiological characteristics of the patients are shown in Table 1. Infection developed in 26 patients (68.4%), most frequently urinary tract infections (54%). At the time of strain isolation, 17 patients were in an intensive care unit (ICU), 12 were in medical wards, and 8 were in surgical wards. The remaining patient was an outpatient who had been hospitalized 9 days earlier in a medical ward. It is remarkable that in all cases the strain was nosocomially acquired.

The isolates were recovered mainly from urine (19 out of 38 patients) and less frequently from other samples (Table 1). In some cases, isolates were recovered from >1 sample from the same patient.

The total mortality was 26% (10 patients), but the deaths were not related directly to infection or colonization by EbSF, or this fact was not reflected in the medical records.

**Antimicrobial susceptibility.** The isolates were characterized by high levels of resistance to different families of antibiotics,  $\beta$ -lactams (with the exception of carbapenems), quinolones, aminoglycosides, and cotrimoxazole (trimethoprim-sulfamethoxazole), according to Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) guidelines (Table 2). In the absence of breakpoints by the CLSI, interpretation for tigecycline (MIC = 2) was performed on the basis of European Committee on Susceptibility (EUCAST) guidelines, and EbSF was categorized as exhibiting intermediate resistance to tigecycline. These results showed that the isolates were MDR. All isolates displayed the same susceptibility pattern. To clarify the mechanism of resistance to  $\beta$ -lactams, isolates were tested by Etest ESBL strips (cefotaxime [CTX]/CTX plus clavulanic acid [CLA], ceftazidime [CAZ]/CAZ plus CLA, and cefepime [FEP]/FEP plus CLA) (Table 2). The cefepime MIC decreased in the presence of clavulanic acid, thus suggesting the presence of an ESBL in these bacterial isolates.

**Clonal relatedness.** Of the 38 isolates involved in the outbreak, 36 were available for molecular analysis by rep-PCR. All isolates were considered genetically similar (similarity coefficient of >95%); some of the 36 strains (*n* = 25) were also studied by PFGE, with identical results and closely related isolates appearing within the same cluster. Only genotypically unrelated *E. cloacae* isolates (ATCC 13874 and two unrelated clinical *E. cloacae* strains) yielded a different DNA band profile



TABLE 1. Patients from whom SFO-1-producing *E. cloacae* was isolated<sup>a</sup>

Patient (sex/age [yr])	Date of first isolation (mo/yr)	Hospital ward	Clinical sample(s)	Other sample(s) <sup>b</sup>	Colonization/infection type	Patient outcome
1 (F/54)	02/2006	RU	Urine	RS, TS, catheter exudate, WE, BAS	UTI	Alive
2 (M/75)	02/2006	Cardiac ICU	BAS		PN	Dead
3 (M/78)	03/2006	Cardiac ICU	BAS		Colonization	Dead
4 (M/68)	05/2006	General surgery	Blood	Feces	Bacteremia	Alive
5 (F/80)	09/2006	ICU	Urine	Catheter	UTI	Dead
6 (M/22)	09/2006	ICU	Urine	AS	UTI	Dead
7 (M/58)	10/2006	ICU	BAS		Colonization	Alive
8 (F/70)	11/2006	Nephrology	WE		Colonization	Alive
9 (F/76)	12/2006	ICU	Urine	Catheter, BAS, AS, feces	Colonization	Alive
10 (F/79)	03/2007	Cardiac ICU	Urine		UTI	Alive
11 (M/80)	04/2007	Cardiac ICU	Blood	BAS	Bacteremia	Dead
12 (M/59)	04/2007	Cardiac ICU	BAS	Feces	Colonization	Alive
13 (F/50)	05/2007	Cardiac surgery	WE		WI	Alive
14 (M/75)	06/2007	Internal medicine	Urine	RS, WE	UTI	Dead
15 (M/73)	06/2007	Infectious unit	Urine, blood	Feces, AS	UTI and bacteremia, secondary	Dead
16 (M/55)	07/2007	ICU	Urine	Feces, BAS	UTI	Dead
17 (M/53)	08/2007	Cardiac ICU	Catheter	Feces	Colonization	Alive
18 (M/72)	08/2007	Urology	Urine		UTI	Alive
19 (M/65)	08/2007	Cardiac ICU	Urine	TS, AS	UTI	Alive
20 (M/58)	08/2007	Spinal cord	WE		WI	Alive
21 (F/71)	08/2007	Cardiac surgery	WE, blood		WI and bacteremia	Dead
22 (M/61)	08/2007	Nephrology	Urine		UTI	Alive
23 (F/61)	10/2007	Nephrology	Urine		Colonization	Alive
24 (M/37)	12/2007	Thoracic surgery	Urine	RS	Colonization	Alive
25 (M/79)	01/2008	Infectious unit	WE		WI	Alive
26 (M/75)	02/2008	Nephrology	Urine	RS	UTI	Alive
27 (F/41)	05/2008	ICU	WE, urine	Feces, RS	WI	Alive
28 (F/55)	12/2008	ICU	BAS	Feces, AS, RS	PN	Dead
29 (M/67)	01/2009	Cardiac surgery	BAS	Aspirate transtracheal, RS	Colonization	Alive
30 (F/59)	01/2009	Plastic surgery	WE		Colonization	Alive
31 (M/75)	02/2009	Internal medicine	Urine		UTI	Alive
32 (M/64)	02/2009	ICU	Urine	Perineal smear, AS, BAS, RS	UTI	Alive
33 (F/84)	03/2009	Vascular surgery	WE	TS, RS	Colonization	Alive
34 (M/47)	06/2009	RU	BAS		Colonization	Alive
35 (F/85)	08/2009	Nephrology	Blood	Catheter	Bacteremia	Alive
36 (M/77)	08/2009	Internal medicine	Urine		UTI	Alive
37 (M/66)	10/2009	Neurosurgery	Urine	RS	UTI	Alive
38 (M/63)	10/2009	Neumology	Sputum	RS, TS	PN	Alive

<sup>a</sup> RS, rectal swab; TS, throat smear; BAS, bronchial secretion; AS, axillary smear; WE, wound exudate; UTI, urinary tract infection; PN, pneumonia; WI, wound infection; ICU, intensive care unit; RU, resuscitation unit; M, male; F, female.

<sup>b</sup> Samples used as colonization controls for patients as part of control measures.

(data not shown). Rep-PCR was previously used to study the epidemiology of *E. cloacae* isolates in an outbreak in northwest Spain (39).

The results of the genotyping and the phenotype analysis suggested that the 36 *E. cloacae* isolates studied probably emerged from the same clone by genetic clonal spread, which enabled us to continue the study with only one strain, from case 8 of the outbreak (EbSF).

**Characterization of  $\beta$ -lactamases.** All clinical isolates produced 2  $\beta$ -lactamases, with isoelectric points of 5.4 and 7.3, which were later identified by sequencing and cloning procedures as being TEM-1 and SFO-1, respectively.

EbSF harbored a plasmid with a size ca. of 60 kbp (pAF-1), which was used to transform *E. coli* strain TG1, obtaining

TG1-pAF1, which displayed an ESBL phenotype and resistance to aminoglycosides and tigecycline (Table 2).

Plasmid pAF-1 was used to clone the ESBL gene. After the selection of transformants, an *E. coli* TG1 transformant harboring a plasmid with a DNA insert of ca. 24 kbp was obtained (pAF-2), which displayed the same ESBL phenotype. At the end, approximately 10 kbp of the insert was sequenced (Fig. 1), and an SFO-1 ESBL gene was identified (also named *ampA*). The sequencing of nucleotides also revealed the presence of the *ampR* gene upstream of *bla*<sub>SFO-1</sub>. The genetic environment of the *bla* gene was sequenced, and two sequences of IS26 surrounding *ampR* and *ampA*, showing complete right inverted repeat (IRR) and left inverted repeat (IRL) features, were found. The IRs are inverted repeat sequences found to the

VOL. 49, 2011

TABLE 2. Susceptibility profile of epidemic SFO-1-producing multiresistant *E. cloacae* and other bacterial strains used in this study

Antibiotic <sup>a</sup>	MIC (μg/ml) for <sup>b</sup> :			
	EbSF <sup>c</sup>	TG1-pAF-1	TG1-pAF-2	<i>E. coli</i> TG1
AMX	>256	>256	>256	1
AMC	>256	96	16	2
PIP	>256	>256	>256	0.5
CTX	>256	>256	>256	0.064
CTX/CTX + CLA	>16/>1	>16/0.032	>16/0.25	<0.25/<0.016
CAZ	16	0.75	12	0.125
CAZ/CAZ + CLA	16/>4	0.5/0.125	8/0.5	<0.5/0.064
FEP	>256	64	>256	0.25
FEP/FEP + CLA	>16/0.125	>16/<0.064	>16/0.064	0.25/<0.064
ATM	>256	8	>256	0.094
IPM	0.5	0.25	0.25	0.25
GEN	>256	>256	>256	0.064
TOB	>256	>256	4	0.125
AMK	>256	>256	0.5	0.125
CIP	>32	0.032	0.016	0.016
SXT	>32	0.016	0.012	0.012
TIG	2	2	0.25	0.25

<sup>a</sup> For EbSF, isolate 8 was used as model for the study of the epidemic SFO-1-producing *E. cloacae* strain.

<sup>b</sup> TG1-pAF-1, *E. coli* TG1 with clinical plasmid pAF-1 harbored by EbSF; TG1-pAF-2, *E. coli* TG1 with plasmid pAF-2 derived from pAF-1.

<sup>c</sup> AMX, amoxicillin; AMC, amoxicillin-clavulanic acid; PIP, piperacillin; CTX, cefotaxime; CLA, clavulanic acid; CAZ, ceftazidime; FEP, cefepime; ATM, aztreonam; IPM, imipenem; GEN, gentamicin; TOB, tobramycin; AMK, amikacin; CIP, ciprofloxacin; SXT, trimethoprim-sulfamethoxazole; TIG, tigecycline.

right and left of some genes that can be targets for the transposition events. The whole segment flanked by two IS26 copies may be considered a putative large composite transposon (9). Further sequencing revealed the presence of a *tniA* transposase upstream of the 5' IS26 and genes involved in mercury resistance (*merA*, *merD*, *merE*, and *urf2*). A gene coding for aminoglycoside acetyltransferase (gentamicin resistance gene [*aac3*]) was found downstream of the 3' IS26 (Fig. 1).

PCR assays for all clinical isolates demonstrated the presence of SFO-1 and its genetic environment in the 38 *E. cloacae* strains, as expected (data not shown).

**Risk factors associated with infection or colonization by EbSF (the epidemic ESBL-producing *E. cloacae* multidrug-resistant strain).** A case-control study was conducted to identify the risk factors associated with infection or colonization by the MDR ESBL-producing *E. cloacae* strain. Twenty-four case

EMERGENCE OF SFO-1-PRODUCING *E. CLOACAE* 825

FIG. 1. Schematic map of the genetic environment surrounding the SFO-1 (*ampA*) gene and its upstream regulator (*ampR*) (9,785 bp). Open reading frames and genes are shown as arrows indicating the orientation of each coding sequence, and the gene name is shown over the corresponding box. IRL and IRR motifs of IS26 are indicated by asterisks.

patients (patients colonized or infected between 2006 and 2007) were compared with 80 control patients in a retrospective study. The results of the comparison between case and control patients by univariate analysis are shown in Table 4. Demographic characteristics and comorbidity were compared between case and control patients, and no significant differences were found.

The following factors were associated with infection with or colonization by the epidemic strain: chronic renal failure, the presence of a central venous catheter, urinary catheterization, prior hospitalization, and tracheostomy. Prior administration of  $\beta$ -lactam antibiotics and quinolones was also more frequent in the infected/colonized group.

Multivariable analysis revealed that the factors independently associated with EbSF infection or colonization were chronic renal failure (odds ratio [OR], 4.85; 95% CI, 1.46 to 16.08), tracheostomy (OR, 7.67; 95% CI, 1.10 to 53.39), and prior hospitalization (OR, 3.90; 95% CI, 1.03 to 14.75). Regarding antibiotics, the prior administration of a  $\beta$ -lactam antibiotic (ampicillin, cloxacillin, amoxicillin-clavulanic acid [AMC], and piperacillin [PIP]) was a significant factor in case patients (OR, 4.24; 95% CI, 1.29 to 13.90) (Table 5).

## DISCUSSION

The present study is the first report of a clonal outbreak of infection caused by an MDR *E. cloacae* strain carrying the SFO-1  $\beta$ -lactamase. This is also the first report of the SFO-1  $\beta$ -lactamase in Europe, since this  $\beta$ -lactamase has been described previously only for a single sample from Japan (22).

This is the first description of an SFO-1-producing *E. cloacae* strain causing epidemiological problems. Documenting of risk factors and identification of vulnerable patient groups are important parts of the management and control of health care-associated infections. We used a case-control study to identify the risk factors associated with the acquisition of ESBL-producing *E. cloacae* strains. The multivariate analysis revealed

TABLE 3. Oligonucleotides used in this study

Amplicon	Product size (bp)	Primer (5'-3')	
		Forward	Reverse
CTX-M group 1	840	ATGGCGACGGCAACCGTCA	CAAACCGTTGGTGACGATTTTA
CTX-M group 9	876	ATGGTGACAAAGAGAGTGC	TTACAGCCCTTCGGCGATG
SHV-12	147	GCGCCATTACCATGAG	AAGCGCTCATTCACTTCCG
TEM-1	551	TAATTGTTGCCGGGAAG	CCAACTGATCTTCAGCA
AmpR-AmpA	1,878	TCTGCCGCTTCTTTCAG	GCCCTTCGGTGACAATTTTA
IS26A-SFO1	2,670	CTTCTCCAACCTGACCGCG	CGCCGTGTTGTCACTGTACT
SFO1-IS26B	2,270	CATTCCAGCGATAAGCG	CAGTGCCAGTCGGCCC

TABLE 4. Univariate analysis of factors associated with colonization or infection with SFO-1-producing *E. cloacae*<sup>a</sup>

Parameter	Value for group		Matched OR (95% CI)	P value
	Cases (n = 24)	Controls (n = 80)		
<b>Demographics</b>				
Mean age (yr) ± SD	64.22 ± 14.23	59.47 ± 18.27		NS
No. (%) of male patients	16 (66.7)	53 (66.2)		NS
<b>Underlying disease</b>				
Mean Charlson score ± SD	5.08 ± 1.99	4.70 ± 2.76		NS
No. (%) of patients with:				
Diabetes mellitus	7 (29.2)	22 (27.5)	1.09 (0.40–2.97)	NS
Solid tumor	2 (8.3)	13 (16.2)	0.47 (0.10–2.24)	NS
Gastrointestinal tract disease	6 (25)	21 (26.6)	0.92 (0.32–2.63)	NS
Cardiovascular disease	13 (54.2)	43 (53.8)	1.02 (0.41–2.54)	NS
Genitourinary tract disease	10 (41.7)	19 (23.8)	2.29 (0.88–5.99)	0.086
Chronic pulmonary disease	3 (12.5)	9 (11.2)	1.13 (0.28–4.54)	NS
Chronic renal failure	12 (50)	18 (22.5)	3.44 (1.32–8.97)	0.009
Immunodeficiency	2 (8.3)	4 (5)	1.73 (0.30–10.06)	NS
Transplantation	3 (12.5)	10 (12.5)	1 (0.26–3.97)	NS
<b>No. (%) of patients with risk factor</b>				
Prior treatment with antibiotics	20 (87)	56 (70)	2.86 (0.77–10.53)	NS
Admission to ICU	7 (30.4)	24 (30)	1.02 (0.37–2.80)	NS
Admission to ICU, coronary	8 (34.8)	28 (35)	0.99 (0.37–2.62)	NS
Recent surgery	16 (66.7)	45 (56.2)	1.56 (0.60–4.05)	NS
Central venous catheter	20 (83.3)	47 (59.5)	3.40 (1.06–10.90)	0.032
Intravascular catheter	21 (87.5)	72 (92.3)	0.58 (0.13–2.53)	NS
Urinary catheter	21 (87.5)	49 (62.8)	4.14 (1.14–15.11)	0.023
Mechanical ventilation	11 (45.8)	22 (27.8)	2.19 (0.85–5.62)	0.098
Prior hospitalization	18 (75)	42 (52.5)	2.71 (0.98–7.55)	0.05
Nasogastric tube	11 (47.8)	32 (40.5)	1.35 (0.53–3.42)	NS
Parenteral nutrition	8 (34.8)	14 (17.5)	2.54 (0.89–7.07)	0.075
Thoracic drainage	9 (37.5)	24 (30.0)	1.40 (0.54–3.64)	NS
Tracheostomy	4 (17.4)	3 (3.8)	5.40 (1.11–26.20)	0.022
Treatment with steroids	6 (33.3)	23 (29.5)	1.20 (0.50–3.18)	NS
Prior infection	13 (54.2)	32 (40)	1.77 (0.70–4.44)	NS
<b>No. (%) of patients with antimicrobial history of:</b>				
Penicillins, AMC, PIP	16 (66.7)	31 (28.8)	3.16 (1.21–8.26)	0.016
Narrow-spectrum CPs	1 (4.2)	4 (5)	0.83 (0.09–7.76)	NS
Expanded-spectrum CPs	3 (12.57)	7 (8.8)	1.49 (0.35–6.27)	NS
Carbapenems	1 (4.2)	13 (16.2)	0.22 (0.3–1.81)	NS
Aminoglycosides	7 (29.2)	11 (13.8)	2.58 (0.87–7.65)	0.08
Quinolones	9 (37.5)	13 (16.2)	3.09 (1.12–8.56)	0.025
Glycopeptides	5 (20.8)	16 (20)	1.05 (0.34–3.25)	NS
Linezolid	2 (8.3)	3 (3.8)	2.33 (0.37–14.85)	NS

<sup>a</sup> Note that data are percentages of patients or mean values ± standard deviations. Significance was determined by a Student's *t* test for quantitative variables and a chi-square test or Fisher's exact test for qualitative variables. OR, odds ratio; CI, confidence interval; NS, not significant; PIP, piperacillin; CPs, cephalosporins.

that the prior administration of β-lactam antibiotics, tracheostomy, prior hospitalization, and chronic renal failure were statistically associated with SFO-1-producing *E. cloacae* acquisition. Most of these risk factors were previously described in the literature (17, 19, 28, 40–42). For patients with chronic renal failure, urinary tract pathology is increased, so chronic renal

failure may indirectly favor urinary tract infection or colonization by EbSF as an important risk factor.

The options for treating these patients were extremely limited. The drugs of choice are carbapenems (mainly imipenem), although their overuse is cause for concern (35). Also, tigecycline has shown good activity against ESBL-producing *Enterobacter* spp. (16). However, in this case it cannot be used as an alternative to carbapenems, as EbSF strains showed a tigecycline MIC of 2 μg/ml (resistant according to EUCAST criteria).

The detection of the ESBL phenotype with the cefepime-clavulanate ESBL Etest is more sensitive than others used for *E. coli* and *Klebsiella* species, because cefepime is a poor substrate for the AmpC β-lactamases that are produced by *Enterobacter* species (18). It is very important to remember this spe-

TABLE 5. Multivariate analysis of risk factors associated with the isolation of the SFO-1-producing *E. cloacae* strain

Risk factor	Adjusted OR (95% CI)	P value
Chronic renal failure	4.85 (1.46–16.08)	0.010
Tracheostomy	7.67 (1.10–53.39)	0.040
Prior hospitalization	3.90 (1.03–14.75)	0.045
Prior administration of β-lactam	4.24 (1.29–13.90)	0.017

cial feature in the detection of the ESBL phenotype in *Enterobacter* species to achieve good practice in microbiology laboratories. The underdetection and underreporting of the spread of ESBL-producing *E. cloacae* isolates may be causing an incorrectly low incidence. The detection of ESBLs in clinical isolates of *E. cloacae* also has important clinical implications, because it influences clinical decisions regarding appropriate therapy and also determines infection control measures, such as patient contact isolation.

Cloning procedures showed that the pattern of resistance to  $\beta$ -lactams, tigecycline, and aminoglycosides of the EbSF strains was plasmid encoded (Table 2). This may facilitate spread by horizontal transmission to other enterobacteria, although this hypothesis has not been tested.

SFO-1 is an infrequently isolated  $\beta$ -lactamase, and its genetic environment has never been determined. Interestingly, SFO-1 is flanked by the full insertion element IS26 with both sites (IRR and IRL), which may allow the  $\beta$ -lactamase to spread itself as an autonomous transposable element. IS26 is usually associated with antibiotic resistance genes and may be involved in dissemination via several routes, including the translocation of resistance genes located in the chromosome (7, 25).

The large number of patients involved, 38 patients, was an important factor for the study of the epidemiology of SFO-1-producing *E. cloacae*, as few reports of *E. cloacae* causing outbreaks have been reported in the medical literature. The study of clonal relatedness by rep-PCR and PFGE patterns showed that all isolates were genotypically related and probably had originated from the same clone. The PFGE and rep-PCR results and the same antibiotic pattern of multidrug resistance for all *E. cloacae* isolates provided further evidence for epidemic spread. PFGE is considered the "gold standard" for the typing of medically important bacteria and identification of different clusters or clones (37). The correlation between PFGE and rep-PCR systems was previously demonstrated for *E. coli* (33) and other members of the *Enterobacteriaceae* (11), but a similar study has never been reported for *E. cloacae*. The advantages and the usefulness of rep-PCR were clearly demonstrated in previous studies (11, 33).

This work provides some data on the unknown epidemiology of ESBL-producing *E. cloacae* strains. The epidemiology of this microorganism is very similar to that of *K. pneumoniae*, since this microorganism is mainly nosocomially acquired (none of the cases were community acquired), and the isolates are usually clonally related (24).

With regard to the modes of transmission of EbSF strains, the most likely explanation was that they were transmitted from one person to another via the hands of health care personnel. Throughout the study, the presence of colonized patients probably favored the endemic spread of the strain. Many of the patients involved were highly colonized and presented rectal, nasal, and axillary samples that were positive for the epidemic strain (Table 1). The rates of colonization with ESBL-producing *E. cloacae* are now increasing significantly, as shown by a study from Chicago between 2000 and 2005 (34). Clearly, patients colonized with ESBL-producing *E. cloacae* strains have an increased risk of developing infection.

The presence of EbSF strains was maintained during a long period, and as some cases still appear, the strain may be en-

demic in the population. It is very important to monitor emerging infection and/or colonization by ESBL-producing *E. cloacae* strains in all hospitals, to attempt to identify the mechanism of resistance in clinical microbiology laboratories, and to take strict epidemiological control measures from the beginning to avoid endemicity, because the control of endemic ESBL producers is very difficult (2, 30, 32).

The data presented here confirm that ESBL-producing *E. cloacae* is emerging as a nosocomial pathogen and demonstrate the epidemic potential of this strain. The emergence of multidrug resistance among nosocomial pathogens such as *E. cloacae* has important implications for the future ability to treat these infections because of the further limitation of available antibiotic agents.

In summary, an MDR epidemic *E. cloacae* strain (susceptible only to carbapenems) expressing the unusual SFO-1 ESBL is described for the first time in Europe (Spain) in the context of a hospital outbreak and affecting a large number of patients.

#### ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by REIPI (Spanish Network for Research in Infectious Diseases), Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Ciencia e Innovación, and A.F. is the receipt of a research support contract (Rio Hortega) from Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Ciencia e Innovación. This work was also funded by FIS grants PI081613, PS09/00687, and PS07/90 and grant 08CSA064916PR from Xunta de Galicia.

#### REFERENCES

- Bradford, P. A. 2001. Extended-spectrum beta-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clin. Microbiol. Rev.* 14:933-951.
- Canton, R., T. M. Coque, and F. Baquero. 2003. Multi-resistant Gram-negative bacilli: from epidemics to endemics. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 16: 315-325.
- Carrer, A., et al. 2009. Outbreak of CTX-M-15-producing *Klebsiella pneumoniae* in the intensive care unit of a French hospital. *Microb. Drug Resist.* 15:47-54.
- Conte, M. P., et al. 2005. Extended spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* outbreaks during a third generation cephalosporin restriction policy. *J. Chemother.* 17:66-73.
- Fang, H., et al. 2004. Molecular epidemiological analysis of *Escherichia coli* isolates producing extended-spectrum beta-lactamases for identification of nosocomial outbreaks in Stockholm, Sweden. *J. Clin. Microbiol.* 42:5917-5920.
- Fernandez, A., et al. 2007. Interspecies spread of CTX-M-32 extended-spectrum beta-lactamase and the role of the insertion sequence IS1 in down-regulating bla CTX-M gene expression. *J. Antimicrob. Chemother.* 59:841-847.
- Ford, P. J., and M. B. Avison. 2004. Evolutionary mapping of the SHV beta-lactamase and evidence for two separate IS26-dependent blaSHV mobilization events from the *Klebsiella pneumoniae* chromosome. *J. Antimicrob. Chemother.* 54:69-75.
- Garner, J. S., W. R. Jarvis, T. G. Emori, T. C. Horan, and J. M. Hughes. 1988. CDC definitions for nosocomial infections, 1988. *Am. J. Infect. Control* 16:128-140.
- Golebiewski, M., et al. 2007. Complete nucleotide sequence of the pCTX-M3 plasmid and its involvement in spread of the extended-spectrum beta-lactamase gene blaCTX-M-3. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51:3789-3795.
- Gouby, A., et al. 1994. Epidemiological study by pulsed-field gel electrophoresis of an outbreak of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in a geriatric hospital. *J. Clin. Microbiol.* 32:301-305.
- Grisold, A. J., et al. Use of automated repetitive-sequence-based PCR for rapid laboratory confirmation of nosocomial outbreaks. *J. Infect.* 60:44-51.
- Hyle, E. P., et al. 2005. Risk factors for increasing multidrug resistance among extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella* species. *Clin. Infect. Dis.* 40:1317-1324.
- Jacoby, G. A. 2009. AmpC beta-lactamases. *Clin. Microbiol. Rev.* 22:161-182.
- Jiang, X., et al. 2005. Outbreak of infection caused by *Enterobacter cloacae* producing the novel VEB-3 beta-lactamase in China. *J. Clin. Microbiol.* 43:826-831.
- Kartali, G., et al. 2002. Outbreak of infections caused by *Enterobacter cloacae* producing the integron-associated beta-lactamase IBC-1 in a neonatal

- intensive care unit of a Greek hospital. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46:1577–1580.
16. Kelesidis, T., D. E. Karageorgopoulos, I. Kelesidis, and M. E. Falagas. 2008. Tigecycline for the treatment of multidrug-resistant *Enterobacteriaceae*: a systematic review of the evidence from microbiological and clinical studies. *J. Antimicrob. Chemother.* 62:895–904.
  17. Kim, Y. K., et al. 2002. Bloodstream infections by extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in children: epidemiology and clinical outcome. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46:1481–1491.
  18. Lee, C. C., et al. 2010. Bacteremia due to extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Enterobacter cloacae*: role of carbapenem therapy. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54:3551–3556.
  19. Lin, M. F., M. L. Huang, and S. H. Lai. 2003. Risk factors in the acquisition of extended-spectrum beta-lactamase *Klebsiella pneumoniae*: a case-control study in a district teaching hospital in Taiwan. *J. Hosp. Infect.* 53:39–45.
  20. Manzoor, A., et al. 2007. Nosocomial outbreak due to extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Enterobacter cloacae* in a cardiothoracic intensive care unit. *J. Clin. Microbiol.* 45:2365–2369.
  21. Mathew, A., A. M. Harris, M. J. Marshall, and G. W. Ross. 1975. The use of analytical isoelectric focusing for detection and identification of beta-lactamases. *J. Gen. Microbiol.* 88:169–178.
  22. Matsumoto, Y., and M. Inoue. 1999. Characterization of SFO-1, a plasmid-mediated inducible class A beta-lactamase from *Enterobacter cloacae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43:307–313.
  23. McGregor, J. C., et al. 2005. Utility of the chronic disease score and Charlson comorbidity index as comorbidity measures for use in epidemiologic studies of antibiotic-resistant organisms. *Am. J. Epidemiol.* 161:483–493.
  24. Mena, A., et al. 2006. Characterization of a large outbreak by CTX-M-1-producing *Klebsiella pneumoniae* and mechanisms leading to in vivo carbapenem resistance development. *J. Clin. Microbiol.* 44:2831–2837.
  25. Miriagou, V., A. Carattoli, E. Tzelepi, L. Villa, and L. S. Tzouveleakis. 2005. IS26-associated In4-type integrons forming multiresistance loci in enterobacterial plasmids. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49:3541–3543.
  26. Moissenet, D., et al. 2010. Meningitis caused by *Escherichia coli* producing TEM-52 extended-spectrum beta-lactamase within an extensive outbreak in a neonatal ward: epidemiological investigation and characterization of the strain. *J. Clin. Microbiol.* 48:2459–2463.
  27. Moriguchi, N., et al. 2007. Outbreak of CTX-M-3-type extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacter cloacae* in a pediatric ward. *J. Infect. Chemother.* 13:263–266.
  28. Ortega, M., et al. 2009. Analysis of 4758 *Escherichia coli* bacteraemia episodes: predictive factors for isolation of an antibiotic-resistant strain and their impact on the outcome. *J. Antimicrob. Chemother.* 63:568–574.
  29. Paauw, A., A. C. Fluit, J. Verhoef, and M. A. Leverstein-van Hall. 2006. *Enterobacter cloacae* outbreak and emergence of quinolone resistance gene in Dutch hospital. *Emerg. Infect. Dis.* 12:807–812.
  30. Paauw, A., et al. 2007. Failure to control an outbreak of qnrA1-positive multidrug-resistant *Enterobacter cloacae* infection despite adequate implementation of recommended infection control measures. *J. Clin. Microbiol.* 45:1420–1425.
  31. Paterson, D. L. 2006. Resistance in Gram-negative bacteria: *Enterobacteriaceae*. *Am. J. Infect. Control* 34:S20–S28, S64–S73.
  32. Paterson, D. L., et al. 2001. Control of an outbreak of infection due to extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in a liver transplantation unit. *Clin. Infect. Dis.* 33:126–128.
  33. Pitout, J. D., et al. 2009. Using a commercial DiversiLab semiautomated repetitive sequence-based PCR typing technique for identification of *Escherichia coli* clone ST131 producing CTX-M-15. *J. Clin. Microbiol.* 47:1212–1215.
  34. Reddy, P., et al. 2007. Screening for extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* among high-risk patients and rates of subsequent bacteremia. *Clin. Infect. Dis.* 45:846–852.
  35. Rodríguez-Bano, J., and A. Pascual. 2008. Clinical significance of extended-spectrum beta-lactamases. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* 6:671–683.
  36. Sanders, W. E., Jr., and C. C. Sanders. 1997. *Enterobacter* spp.: pathogens poised to flourish at the turn of the century. *Clin. Microbiol. Rev.* 10:220–241.
  37. Tenover, F. C. 2007. Rapid detection and identification of bacterial pathogens using novel molecular technologies: infection control and beyond. *Clin. Infect. Dis.* 44:418–423.
  38. Tenover, F. C., et al. 1995. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J. Clin. Microbiol.* 33:2233–2239.
  39. Treviño, M., L. Moldes, L. Martínez-Lamas, C. Varon, and B. J. Regneiro. 2009. Carbapenem-resistant *Enterobacter cloacae* and the emergence of metallo-beta-lactamase-producing strains in a third-level hospital (Santiago de Compostela, NW Spain). *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 28:1253–1258.
  40. Tumbarello, M., et al. 2004. ESBL-producing multidrug-resistant *Providencia stuartii* infections in a university hospital. *J. Antimicrob. Chemother.* 53:277–282.
  41. Tumbarello, M., et al. 2008. Bloodstream infections caused by extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli*: risk factors for inadequate initial antimicrobial therapy. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52:3244–3252.
  42. Tumbarello, M., et al. 2006. Bloodstream infections caused by extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae*: risk factors, molecular epidemiology, and clinical outcome. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50:498–504.
  43. Velasco, C., et al. 2009. Eradication of an extensive outbreak in a neonatal unit caused by two sequential *Klebsiella pneumoniae* clones harbouring related plasmids encoding an extended-spectrum beta-lactamase. *J. Hosp. Infect.* 73:157–163.
  44. Vranic-Ladavac, M., et al. 2010. Clonal spread of CTX-M-15-producing *Klebsiella pneumoniae* in a Croatian hospital. *J. Med. Microbiol.* 59:1069–1078.



### **7.3. Anexo III**







## Expression of OXA-Type and SFO-1 $\beta$ -Lactamases Induces Changes in Peptidoglycan Composition and Affects Bacterial Fitness

Ana Fernández,<sup>a</sup> Astrid Pérez,<sup>a</sup> Juan A. Ayala,<sup>b</sup> Susana Mallo,<sup>a</sup> Soraya Rumbo-Feal,<sup>a</sup> María Tomás,<sup>a</sup> Margarita Poza,<sup>a</sup> and Germán Bou<sup>a</sup>

Servicio de Microbiología, Complejo Hospitalario Universitario A Coruña, A Coruña, Spain,<sup>a</sup> and Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, CSIC-UAM, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid, Spain<sup>b</sup>

**$\beta$ -Lactamases and penicillin-binding proteins (PBPs) have evolved from a common ancestor.  $\beta$ -Lactamases are enzymes that degrade  $\beta$ -lactam antibiotics, whereas PBPs are involved in the synthesis and processing of peptidoglycan, which forms an elastic network in the bacterial cell wall. This study analyzed the interaction between  $\beta$ -lactamases and peptidoglycan and the impact on fitness and biofilm production. A representative set of all classes of  $\beta$ -lactamases was cloned in the expression vector pBGS18 under the control of the CTX-M promoter and expressed in *Escherichia coli* MG1655. The peptidoglycan composition of all clones was evaluated, and quantitative changes were found in *E. coli* strains expressing OXA-24, OXA-10-like, and SFO-1 (with its upstream regulator AmpR)  $\beta$ -lactamases; the level of cross-linked mucopeptides decreased, and their average length increased. These changes were associated with a statistically significant fitness cost, which was demonstrated in both *in vitro* and *in vivo* experiments. The observed changes in peptidoglycan may be explained by the presence of residual DD-endopeptidase activity in these  $\beta$ -lactamases, which may result in hydrolysis of the peptide cross bridge. The biological cost associated with these changes provides important data regarding the interaction between  $\beta$ -lactamases and the metabolism of peptidoglycan and may provide an explanation for the epidemiology of these  $\beta$ -lactamases in *Enterobacteriaceae*.**

Antibiotic resistance is currently one of the main problems in public health. The most widespread and threatening mechanism of antibiotic resistance is the production of  $\beta$ -lactamases, enzymes that degrade  $\beta$ -lactam antibiotics.  $\beta$ -Lactamases exhibit diversity in both structure and function. The simplest classification (described by Ambler), based on the protein sequence, divides  $\beta$ -lactamases into four molecular classes (A to D) (1). Members of classes A, C, and D are serine-dependent enzymes, while members of class B are metalloenzymes that use zinc to facilitate  $\beta$ -lactamase hydrolysis. Moreover, the classification scheme described Bush and Jacoby (13), which is based on functional similarities (assessed by substrate and inhibitor profile), is of greater significance to physicians and microbiologists in diagnostic laboratories because it considers clinically relevant  $\beta$ -lactams and inhibitors.

The targets of  $\beta$ -lactam antibiotics are penicillin-binding proteins (PBPs). PBPs are involved in the synthesis and processing of peptidoglycan (PG) (41), which forms an elastic network in the cell wall. The main functions of this network are to resist the intracellular pressure of the cell and to maintain a defined cell shape (44).

All  $\beta$ -lactamases and PBPs evolved from a common ancestor, the primordial PBP, in independent and perhaps parallel processes (27), and each is specialized in different functions; PBPs display transpeptidase, carboxypeptidase, or endopeptidase activity (41), and  $\beta$ -lactamases inactivate  $\beta$ -lactam antibiotics by hydrolyzing the  $\beta$ -lactam ring. However, PBP5 from *Pseudomonas* has been described as a weak  $\beta$ -lactamase (23). Conversely, mutation of certain PBPs modifies the expression of  $\beta$ -lactamases (such as PBP4 and AmpC in *Pseudomonas aeruginosa*) (32). The AmpC-type  $\beta$ -lactamase from *Citrobacter* has also been suggested to display residual DD-carboxypeptidase activity *in vivo*, with an effect on fitness when expressed in *Salmonella* (31). The interaction between resistance mechanisms and bacterial fitness is a subject of increasing interest. The effect of these mechanisms on fit-

ness is a key parameter for evaluating the epidemiological implications for a given microorganism, which depend on its ability to persist in bacterial populations once the selective pressure exerted by antibiotics disappears.

Measurement of bacterial fitness competition between bacteria expressing different  $\beta$ -lactamases provides a sensitive method for detecting phenotypic differences (34). Furthermore, the acquisition of plasmids with antibiotic resistance genes may have several effects on bacterial fitness (2, 25). Hence, the objectives of the present study were (i) to determine the interaction between the expression of  $\beta$ -lactamases and the composition and/or structure of PG and (ii) to analyze the influence of these changes in PG on fitness and biofilm formation.

### MATERIALS AND METHODS

**$\beta$ -Lactamases: cloning experiments and determination of specific activity.** A set of isogenic clones expressing representative members of all classes of  $\beta$ -lactamases was constructed (Table 1). All  $\beta$ -lactamases were cloned between BamHI and EcoRI restriction sites into the pBGS18-pCT vector (pB) under the control of a *bla*<sub>CTX-M</sub> promoter, an expression vector harboring a kanamycin resistance gene. *Escherichia coli* was chosen as an *Enterobacteriaceae* model for further studies. The *E. coli* MG1655 (MG) (14) electrocompetent strains were transformed with these plasmid constructions. To confirm the accuracy of the nucleotide sequences, all cloned genes were sequenced following standard procedures.

To study the specific activity, the bacterial strains were grown overnight in 50 ml of Luria-Bertani (LB) broth at 37°C with shaking. The cells

Received 27 July 2011. Returned for modification 19 October 2011.

Accepted 13 January 2012.

Published ahead of print 30 January 2012.

Address correspondence to Germán Bou, German.Bou.Arevalo@sergas.es.

Copyright © 2012, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

doi:10.1128/AAC.05402-11

Fernández et al.

TABLE 1  $\beta$ -Lactamases expressed in this study

B-lactamase	Ambler class	Hydrolysis antibiotics	Host(s) most frequently encountered	Reference(s)	Oligonucleotide sequences used for cloning (5' → 3') <sup>a</sup>
TEM-1	A	Penicillins, early cephalosporins	<i>Escherichia coli</i>	8, 12	F, ggatccATGAGTATTCAACATTTTCGTGTC; R, gaattcTTACCAATGCCTTAATCAGTGAGG
TEM-29	A	ESBL <sup>b</sup>	<i>E. coli</i> and <i>Klebsiella pneumoniae</i>	8, 12	F, ggatccATGAGTATTCAACATTTCCGTGT; R, gaattcTTACCAATGCCTTAATCAGTGAGG
CTX-M-32 (cluster 1)	A	ESBL (100-fold more active against ceftazidime than the other CTX-Ms)	<i>Enterobacteriaceae</i>	15, 24, 35	F, ggatccATGGTTAAAAAATCACTGCGTCA; R, gaattcTTACAAACCGTTGGTGACGAT
CTX-M-8 (cluster 8)	A	ESBL	<i>Enterobacteriaceae</i>	6, 24, 35	F, ggatccATGATGAGACATCGCGTTAAG; R, gaattcTTAATAACCGTCGGTGACGAT
CTX-M-2 (cluster 2)	A	ESBL	<i>Enterobacteriaceae</i>	24, 35; this work	F, ggatccATGATGACTCAGAGCATTCC; R, gaattcTCAGAAACCGTGGGTACG
CTX-M-14 (cluster 9)	A	ESBL	<i>Enterobacteriaceae</i>	7, 24, 35	F, ggatccATGGTGACAAAGAGAGTGCAA; R, gaattcTTACAGCCCTTCGGCGAT
SFO-1	A	ESBL	<i>Enterobacter cloacae</i>	16, 28	F, ggatccATGGTTAAAAATACATTACGTCAAA; R, gaattcTCAAAGCCCTTCGGTGACAA
AmpR-SFO-1	A	ESBL	<i>Enterobacter cloacae</i>	16, 28	F, ggatccCTACGTATTATCTTCTGCCGC; R, gaattcTCAAAGCCCTTCGGTGACAA
VIM-1	B	Most $\beta$ -lactams, except aztreonam, including carbapenems	<i>Pseudomonas</i> , <i>Enterobacteriaceae</i>	30, 45	F, ggatccATGTTAAAGTTATTAGTAGTTTATTGG; R, gaattcCTACTCGGCGACTGAGC
FOX-4	C	Penicillins, narrow-, expanded-, and broad-spectrum cephalosporins, including cephamycins	<i>Enterobacteriaceae</i>	10, 20, 26	F, ggatccATGCAACAACGACGTGCG; R, gaattcTCACTCGGCCAACTGACTC
OXA-10-like	D	Oxacillin, cloxacillin	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	12; this work	F, ggatccATGAAAACATTGCGCGATATGTA; R, gaattcTTAGCCACCAATGATGCCCT
OXA-24	D	Oxacillin, cloxacillin, carbapenems	<i>Acinetobacter baumannii</i>	9, 29	F, ggatccATGAAAAAATTATCTTCCTATATTCA; R, gaattcTTAAATGATTCGAAGATTTCCTAGCG

<sup>a</sup> F, forward; R, reverse. Lowercase indicates target site for restriction enzymes.<sup>b</sup> ESBL, hydrolysis profile that confers resistance to the penicillins, broad-spectrum cephalosporins, and monobactams but not the cephamycins or carbapenems.

were harvested by centrifugation, washed once with potassium-sodium phosphate (phosphate-buffered saline [PBS]), and resuspended in 1 ml of the same buffer. To obtain the cell extract, cells were broken by ultrasonic treatment at 4°C. Cell debris was removed by centrifugation at 10,000 rpm for 10 min. The specific enzyme activity of each extract was determined by measuring the hydrolysis of a 100  $\mu$ M nitrocefin solution prepared in dimethyl sulfoxide (DMSO), monitored at 25°C, in a spectrophotometer at a wavelength of 485 nm. Protein concentration was measured by the Bradford method (11).

**Peptidoglycan analysis.** PG was purified from bacterial cells grown in LB broth to an optical density at 600 nm ( $OD_{600}$ ) of 1. We added imipenem, at a concentration of 0.06  $\mu$ g/ml (ca. 1/4 of the MIC), at the beginning of the culture. The bacteria were collected, suspended in 3 ml of PBS, mixed immediately in a 1:1 (vol/vol) proportion with a boiling solution of 10% sodium dodecyl sulfate (SDS) (Bio-Rad), and maintained at 100°C for 18 h. The SDS-insoluble material, containing PG, was washed until it was free of SDS by successive suspensions in distilled water and centrifuged at high speed at room temperature. PG was treated with  $\alpha$ -amylase (100  $\mu$ g/ml) at 37°C for 90 min and with pronase E (100  $\mu$ g/ml) at 60°C for 60 min. The reaction was stopped by adding SDS and boiling the mixture for 20 min. The PG was further digested in 50 mM phosphate buffer (pH 4.9) with Cellosyl (Hoechst AG, Frankfurt, Germany) at a 100- $\mu$ g/ml final concentration at 37°C overnight. The insoluble material was removed by centrifugation, and soluble muropeptides were reduced with sodium borohydride and frozen at -70°C. The muropeptide-digested samples were analyzed by high-performance liquid chromatography (HPLC) as previously described (43). The subunits which comprise the polymer murein and were resolved by HPLC have been

described previously (19, 44). The basic disaccharide peptide subunit (monomer) consists of  $\beta$ -1,4-linked GlcNAc and MurNAc with a peptide stem of three, four, or five residues. Cross-linked monomers with a single bond are dimers, and those with two bonds are trimers. Monomers, dimers, and trimers ending with a 1,6-anhydro-MurNAc residue are termed anhydro, and they correspond to chain ends. Subunits having a peptide bond with the Lpp protein are termed Lpp. Pentapeptides are any subunit having a five-residue peptide stem. Glycan strand chain length (chain length) was calculated as the inverse of the total proportion of anhydro muropeptides. Cross-linking was calculated as the percentage of dimers or trimers ( $\times 2$ ) in relation to the total amount of muropeptides. In some cases (MG alone and MG with the TEM-1, VIM-1, AmpR-SFO-1, OXA-10-like, and OXA-24  $\beta$ -lactamases), experiments were also done without imipenem (see Table 2).

**TEM.** For analysis by transmission electron microscopy (TEM), the strains with the different plasmid constructions were cultured overnight in the presence of 0.06  $\mu$ g/ml of imipenem. Cells were then harvested and resuspended in 4% cold glutaraldehyde diluted in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4), allowed to stand for 30 min at room temperature, and fixed in 1% osmium tetroxide in the same buffer for 1 h at 4°C. Pellets were then dehydrated in an acetone gradient and embedded in Spurr resin. Ultrathin sections (70 nm) were examined and photographed using a JEOL JEM 1010 TEM (80 kV).

**Bacterial growth.** All bacterial strains were grown in LB broth at 37°C and 180 rpm. Growth was monitored by measuring the  $OD_{600}$ . The growth rate ( $\mu$ ) was calculated on the basis of the exponential segment of the growth curve and defined as  $\ln_2 g^{-1}$ , where  $g$  is the doubling time of an exponentially growing culture (3). Experiments were done in triplicate.

TABLE 2 Muropeptide compositions of peptidoglycans from *E. coli* MG1655 carrying pBGS18-pCT (plasmid alone, control strain) and different  $\beta$ -lactamases<sup>a</sup>

Sample <sup>b</sup>	Relative abundance (mol%) <sup>c</sup>							Chain length
	Monomers	Dimers	Trimers	Lpp	Anhydrous forms	Pentapeptides	Cross-linkage (%)	
MG(pBGS18-pCT)	61.0 ± 0.8	36.1 ± 0.8	2.9 ± 0.1	18.0 ± 0.4	8.6 ± 1.4	0.3 ± 0.2	42.0 ± 0.9	11.9 ± 2
MG(pBTEM-1)	62.9 ± 2.8	34.9 ± 3.2	2.8 ± 0.3	16.1 ± 2.9	8.4 ± 1.1	0.8 ± 0.06	40.5 ± 3.7	12 ± 1.5
MG(pBTEM-29)	62.8 ± 2.6	33.5 ± 3.4	3.8 ± 0.8	14.8 ± 4.1	10.9 ± 1.1	0.5 ± 0.02	41.1 ± 1.8	9.2 ± 0.9
MG(pBCTX-M-32)	63.1 ± 0.2	34 ± 0.3	2.7 ± 0.03	14.1 ± 0.9	7.0 ± 0.04	0.2 ± 0.02	39.6 ± 0.1	14.3 ± 0.07
MG(pBCTX-M-8)	64 ± 0.4	33.6 ± 0.5	2.4 ± 0.03	13.1 ± 1.8	5.4 ± 0.3	0.23 ± 0.01	38.4 ± 0.4	18.3 ± 1.0
MG(pBCTX-M-2)	63.3 ± 0.5	33.7 ± 0.4	2.9 ± 0.9	14.9 ± 1.7	6.4 ± 0.2	0.3 ± 0.1	39.7 ± 1.3	15.7 ± 0.5
MG(pBCTX-M-14)	62.5 ± 0.5	34.8 ± 0.3	2.7 ± 0.2	15.6 ± 2.1	6.9 ± 0.7	0.1 ± 0.001	40.3 ± 0.7	14.7 ± 1.5
MG(pBSFO1)	61.3 ± 1.3	35.1 ± 0.7	3.7 ± 0.6	15.4 ± 0.9	12.1 ± 3	0.5 ± 0.3	42.4 ± 1.9	8.8 ± 2.8
MG(pBAmpR-SFO1)	68.7 ± 0.2	29.4 ± 0.2	1.9 ± 0.02	12.7 ± 0.01	3.3 ± 0.1	0.1 ± 0.02	33.3 ± 0.2	29.8 ± 1.2
MG(pBVIM-1)	61.2 ± 2.1	35.8 ± 1.5	2.9 ± 0.6	15.5 ± 2.3	6.4 ± 1.0	0.2 ± 0.1	41.8 ± 2.7	15.9 ± 2.5
MG(pBFOX-4)	63.7 ± 0.5	33.8 ± 0.7	2.4 ± 0.2	12.2 ± 1.6	5.8 ± 0.1	0.3 ± 0.04	38.6 ± 0.4	17.2 ± 0.3
MG(pBOXA-10-like)	65.9 ± 0.1	31.8 ± 0.1	2.3 ± 0.02	12.2 ± 0.1	4.9 ± 0.8	0.2 ± 0.2	36.3 ± 0.1	20.7 ± 3
MG(pBOXA-24)	68.9 ± 1	28.8 ± 0.9	2.2 ± 0.2	12.2 ± 2.3	3.6 ± 0.2	0.1 ± 0.03	33.3 ± 1.2	28.1 ± 0.5
MG(pBGS18-pCT) <sup>d</sup>	69.5 ± 0.7	28.3 ± 0.6	2.3 ± 0.12	11.8 ± 1.35	4.3 ± 0.1	0.1 ± 0.1	32.8 ± 0.8	23.4 ± 0.7
MG(pBTEM-1) <sup>d</sup>	68.1 ± 0.2	29.4 ± 0.4	2.5 ± 0.2	13.3 ± 0.6	4.9 ± 0.3	0.1 ± 0.1	34.4 ± 0.1	20.5 ± 1.2
MG(pBAmpR-SFO1) <sup>d</sup>	69.1 ± 1.6	28.7 ± 1.5	2.3 ± 0.2	12.1 ± 1.3	4.9 ± 0.7	0.1 ± 0.04	33.2 ± 1.8	20.5 ± 2.8
MG(pBVIM-1) <sup>d</sup>	69.2 ± 1.0	28.4 ± 0.6	2.35 ± 0.4	11.9 ± 0.9	4.5 ± 1.8	0.1 ± 0.01	33.2 ± 1.3	20.1 ± 3.7
MG(pBOXA-10-like) <sup>d</sup>	74.2 ± 5.9	25.9 ± 2.8	2.4 ± 0.5	11.6 ± 0.6	4.8 ± 2.2	0.07 ± 0.01	32.6 ± 0.8	21.5 ± 3.5
MG(pBOXA-24) <sup>d</sup>	69.2 ± 0.8	28.5 ± 0.5	2.3 ± 0.3	9.9 ± 3.0	3.8 ± 0.2	0.2 ± 0.1	33.1 ± 1.1	26.5 ± 1.2

<sup>a</sup> Values are means and standard deviations from three independent experiments. Boldface indicates the isolates in which changes in the PG composition have been described.<sup>b</sup> Peptidoglycan of *E. coli* MG1655 transformed with the indicated plasmid.<sup>c</sup> Muropeptides are grouped according to structural similarities, differences in PG composition, and structure of strains.<sup>d</sup> Data were obtained without the presence of imipenem.

**In vitro competition experiments (in vitro fitness).** Experiments were performed to measure the *in vitro* competition between  $\beta$ -lactamase clones and *E. coli* MG1655 with the pBGS18-pCT vector [MG(pB)]. Exponentially growing cells of the corresponding transformant and control strain were mixed in a 1:1 proportion and resuspended in 0.9% saline solution. Approximately  $10^5$  cells from each mixture were inoculated into 10-ml flasks of LB broth and grown at 37°C and 180 rpm for 16 to 18 h, which corresponds to approximately 20 cell generations. Serial 10-fold dilutions were plated in duplicate onto LB agar (LBA) with 50  $\mu$ g/ml of kanamycin (LBA-K) and LBA with 50  $\mu$ g/ml of kanamycin and ampicillin (LBA-K/A) in order to determine, respectively, the total number of CFU and the CFU of the clones harboring  $\beta$ -lactamases, after overnight incubation at 37°C. The competition index (CI) was defined as the ratio between the CFU of the strain harboring a  $\beta$ -lactamase and the MG(pB) strain. The CI values were calculated for each independent competition assay, and the median values were calculated too. Statistical analysis of the distribution of the CI values was performed with the Mann-Whitney U test. Differences were considered statistically significant at a *P* value of <0.05 (33).

**Fitness in the mouse model of systemic infection (in vivo fitness).** *In vivo* fitness was assessed by competition experiments with a mouse model of systemic infection. For this purpose, mixtures of each of the strains containing approximately  $5 \times 10^6$  exponentially growing cells were inoculated intraperitoneally into five female C54 mice, of about 18 to 20 g in weight, previously treated with cyclophosphamide (100 mg/kg) for 3 days. The mice were sacrificed at 24 h after inoculation, and their spleens were aseptically extracted and homogenized in 1 ml of 0.9% saline solution in a Retsch MM200 mixer mill. The number of CFU of each strain and the CI values were determined as described for *in vitro* competition experiments.

**Static biofilm assays.** Static assays of biofilm formation, by determining adherence to polystyrene, were performed as described previously (39) with some modifications. Isolates of *E. coli* were grown overnight in 5 ml LB broth (37°C, 180 rpm). After overnight incubation, *E. coli* cultures were standardized to an optical density of 0.2 at 600 nm. All standardized cultures were inoculated 1/20 in 150  $\mu$ l of M9 with glucose (0.2%) in a

96-well polystyrene microtiter plate (U bottom; Soria Genlab S.A.). Test plates were transferred to plastic bags to avoid evaporation of medium and incubated at 37°C for 48 h without shaking. Eight wells were inoculated for each strain. After removal of planktonic cells, the wells were rinsed with 0.9% sodium chloride and biofilms were stained with 200  $\mu$ l of 0.2% crystal violet (CV). After 15 min, the plate was rinsed with 0.9% sodium chloride. The amount of biofilm formed in each well was determined spectrophotometrically after solubilization of the CV retained with 200  $\mu$ l of an 80:20 mixture of ethyl alcohol and acetone. The absorbance of CV was measured at 570 nm in an automated 96-well plate reader.

## RESULTS

Clones carrying the different  $\beta$ -lactamases were obtained (Table 2); MG carrying pB, without any  $\beta$ -lactamase, was used as a negative control. Although the OXA-10-like enzyme has two amino acid changes compared to the wild-type OXA-10 (Met99Tyr and Gly212Met), kinetic parameters, such as  $K_{cat}$  and  $K_m$ , toward ampicillin and oxacillin were the same for the OXA-10-like enzyme and wild-type OXA-10 (data not shown). No imipenem hydrolysis was detected with this OXA-10-like variant. The relative specific activities of MG carrying pB-AmpR-SFO-1 or pB-SFO-1 against nitrocefin were  $520 \pm 9 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  and  $140 \pm 16 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ , respectively. The results revealed higher hydrolytic activity against nitrocefin when the SFO-1- $\beta$ -lactamase gene was cloned with the upstream *ampR* gene (pB-AmpR-SFO-1 construction), which is consistent with previous findings (28).

The expression of all  $\beta$ -lactamases was checked by determination of the MICs of specific antibiotics, which depend on the characteristic hydrolytic profile of each  $\beta$ -lactamase. All clones showed appropriate susceptibility antibiotic profile according to previously reported data, thus demonstrating proper expression of all  $\beta$ -lactamases. Imipenem MICs were identical with all strains

Fernández et al.

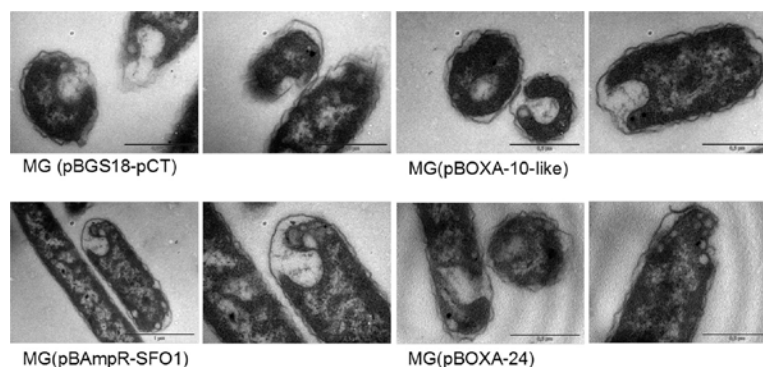


FIG 1 Transmission electron microscopy analysis of *E. coli* MG1655 strains harboring pBOXA-10-like and pBAmpR-SFO1 recombinant plasmids and of control strain MG(pBGS18-pCT).

(0.25  $\mu\text{g/ml}$ ) except MG expressing the VIM-1 and OXA-24  $\beta$ -lactamases, which showed a 1-dilution increase in MIC.

**Effect of  $\beta$ -lactamase production on *E. coli* PG composition.** The steady-state length distribution of glycan strands in *E. coli* is extremely broad and depends on the strain, conditions, and growth phase (44). Representative  $\beta$ -lactamases of all classes were therefore cloned into a vector with identical genetic environment, and extraction and analysis of PG were performed under identical experimental conditions in three independent experiments. The PG compositions of *E. coli* producing different  $\beta$ -lactamases are detailed in Table 2.

No major qualitative differences were found in the PG from any of the strains harboring different  $\beta$ -lactamases. However, some quantitative changes in MG1655 strains carrying pB-OXA-10-like, pB-OXA-24, and pB-AmpR-SFO-1 were found, showing a decrease in the levels of dimers and trimers, anhydrous mucopeptides, and pentapeptides and an increase in monomers and lipoprotein-bound mucopeptides (Table 2). In addition, the level of cross-linked mucopeptides decreased and the average length increased in these strains. The mucopeptide compositions of PG in the remaining strains were almost identical to that of the con-

trol *E. coli* MG1655 with pBGS18-pCT vector [MG-(pB)]. For comparative purposes, data for with MG1655 expressing the TEM-1, OXA-10-like, VIM-1, AmpR-SFO-1, and OXA-24 enzymes without imipenem are also shown (Table 2).

**TEM.** Transmission electron microscopy (TEM), in which an electron beam is passed through ultrathin sections and produces an image of the sample, has been used to investigate the effects of antibiotics on the cell wall, and morphological and structural changes have been observed (42). The morphologies of MG1655 strains carrying recombinant vectors pB-AmpR-SFO-1, pB-OXA-10-like, pB-OXA24, and pBGS18-pCT were analyzed by TEM. Despite the quantitative compositional changes in the PGs of these strains, it was not possible to observe any ultrastructural changes in the cell wall by TEM (Fig. 1).

**Growth curves.** A growth curve experiment was performed to assess the growth rates under noncompetitive conditions and therefore to check the effects of carrying the plasmids on the *E. coli* growth rate. The curve patterns were similar for all strains (Fig. 2). All strains showed a similar growth rate ( $\mu$ ), with values ranging from 0.021 to 0.023, regardless of the expressed  $\beta$ -lactamases.

**In vitro competition experiments (in vitro fitness).** In an

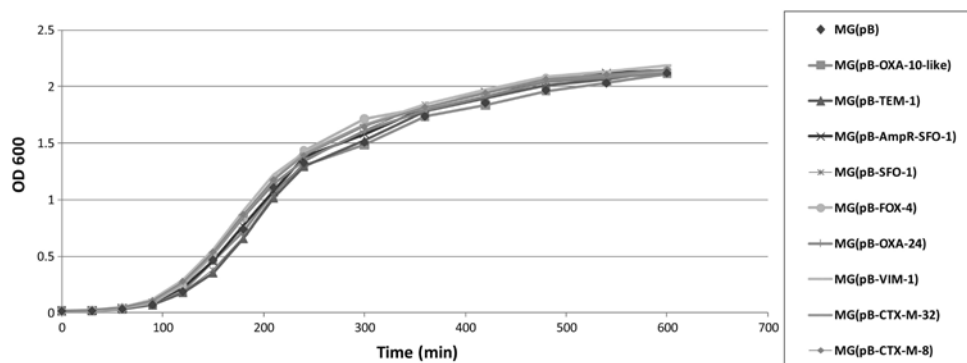


FIG 2 Growth curves for *E. coli* MG1655 harboring different  $\beta$ -lactamases in LB medium. Data are mean values of three measurements. For simplification, error bars have been omitted, although in all cases the standard deviation was  $<10\%$ .



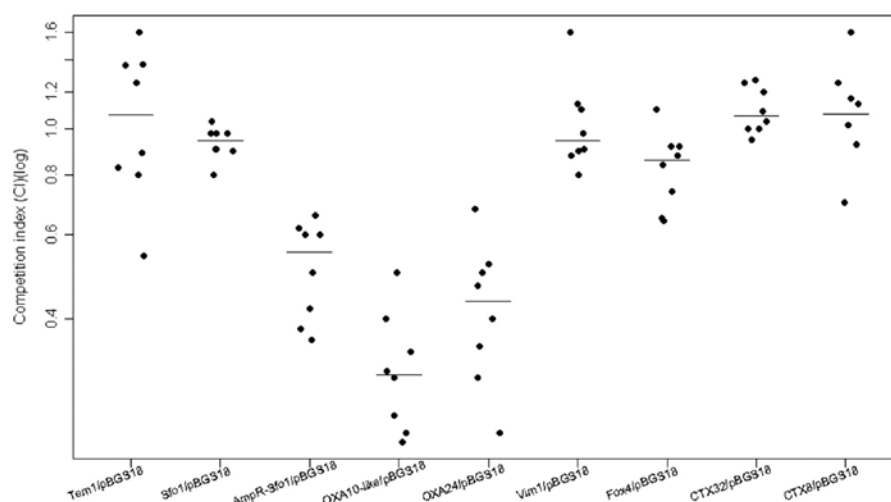


FIG 3 Results of *in vitro* competition experiments. The CI values obtained for each of the eight independent experiments are plotted, with the median CI values shown by horizontal lines.

antibiotic-free environment, bacterial strains carrying plasmids harboring resistance genes compete with those strains that do not possess such resistance genes. The outcome of the competition process depends on the relative fitness, defined as the efficacy of multiplication of the resistant cell compared with that of the susceptible cell. The presence of plasmids encoding CTX-M  $\beta$ -lactamases, such as pB-CTX-M-32 and pB-CTX-M-8, pB-TEM-1, pB-VIM-1, and pB-FOX-4, was not associated with a significant fitness cost with respect to *E. coli* MG(pB) *in vitro*. However, we observed a marked and statistically significant decrease in fitness competition for *E. coli* MG1655 carrying recombinant plasmids pB-AmpR-SFO-1, pB-OXA-10-like, and pB-OXA-24, as shown by the competition index (CI) results in Fig. 3 ( $P < 0.05$  in all cases). The greatest decrease was observed for the MG(pB-OXA-10-like)/MG(pB) competition, with a median CI of 0.3, followed by the MG(pB-OXA-24)/MG(pB) and MG(pB-AmpR-SFO-1)/MG(pB) competitions, with median CIs of 0.43 and 0.55, respectively.

It is remarkable that those  $\beta$ -lactamases that showed changes in the quantitative composition of PG were clearly and directly associated with a reduction in fitness cost (Table 2 and Fig. 3). Overall, the data showed that the median CI values for the MG1655 strains carrying plasmids pB-AmpR-SFO-1, pB-OXA-10-like, and pB-OXA-24 were associated with a statistically significantly decreased fitness in the *in vitro* experiments.

**Fitness in the mouse model of systemic infection (*in vivo* fitness).** Since results obtained *in vitro* and *in vivo* do not always correspond and since an animal model is much closer to what occurs in the human body at the infection site, we assessed the competition assays in a mouse model of systemic infection. The results were similar to those obtained *in vitro* (Table 3). MG(pB-OXA-10-like) and MG(pB-AmpR-SFO-1) were associated with a significantly increased ( $P < 0.001$ ) biological cost, and MG(pB-TEM-1) and MG(pB-SFO-1) did not show any biological cost

effect since fitness was the same as in the MG(pBGS18-pCT) control strain. In the case of OXA-24, an effect similar to that obtained in the *in vitro* assays was observed (data not shown). It is important to emphasize that the effect on biological cost obtained with SFO-1 with its upstream AmpR regulator is abrogated when the  $\beta$ -lactamase gene lacks its AmpR positive regulator, thus demonstrating that the effect is directly related to the  $\beta$ -lactamase gene expression.

**Biofilm production.** In order to assess whether the changes in PG composition had any effect on biofilm formation, those strains in which changes in PG composition had been observed were assayed for biofilm formation. All the studied strains formed less biofilm than the control strain carrying the pBGS18-pCT vector (Fig. 4).

## DISCUSSION

Understanding the physiological basis of fitness costs in isolates carrying  $\beta$ -lactamases is clinically relevant, since  $\beta$ -lactams are the most frequently used treatment for bacterial infections and  $\beta$ -lactamases constitute the main mechanism of resistance to  $\beta$ -lactams in Gram-negative bacilli. The main aim of this study was to assess biological changes in PG composition in members of *Enterobacteriaceae* expressing  $\beta$ -lactamases in relation to their fitness. In this respect, there is some information on changes in the PG com-

TABLE 3 Results of *in vivo* competition experiments in the mouse model of systemic infection

Competition	Median CI (range)
TEM-1/pBGS18	1.15 (1.01–1.35)
SFO-1/pBGS18	1.08 (0.8–1.5)
AmpR-SFO1/pBGS18	0.3 (0.2–0.51) <sup>a</sup>
OXA-10-like/pBGS18	0.32 (0.25–0.68) <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Significant ( $P < 0.001$ ).

Fernández et al.

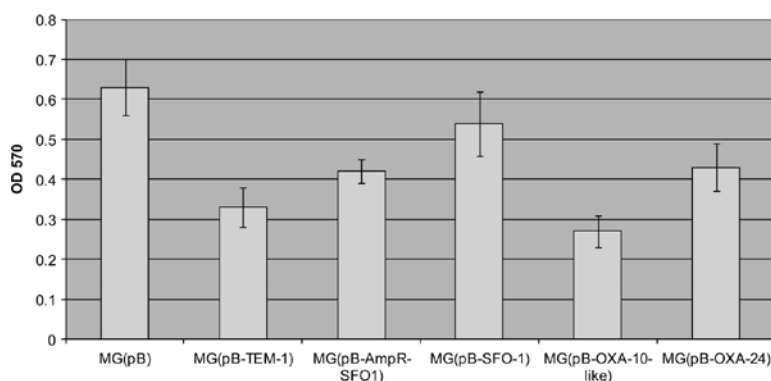


FIG 4 Effects of  $\beta$ -lactamases on biofilm formation. Static biofilm formation by *E. coli* MG1655 on polystyrene is shown. Results are the mean values from eight experiments in the presence of 0.06  $\mu$ g/ml imipenem.

position of *Salmonella* strains producing AmpC and their effect on virulence (31), although their relationship to fitness has not been described. It is difficult to address this topic because of the diversity of genetic factors, which may affect the final result. The experiments presented here were therefore performed on isogenic strains and under identical conditions, so that the results reflect the precise relationship between  $\beta$ -lactamases, PG composition, and fitness.

An effect of  $\beta$ -lactamases on PG composition was observed when imipenem was added at subinhibitory concentrations. This low imipenem concentration was sufficient to increase the sensitivity of the assay induced by the expression of  $\beta$ -lactamases and to observe its effect on PG composition. As a consequence, the interaction between different  $\beta$ -lactamases and PG was magnified, and changes were observed when the recombinant strains carrying  $\beta$ -lactamases were compared with the *E. coli* control strain without any  $\beta$ -lactamase.

The binding of the cell wall donor strand (-D-Ala-D-Ala) to the active-site serine of the PBP can be mimicked by the interactions of  $\beta$ -lactams with the same enzymes. Therefore, the  $\beta$ -lactamases, which bind the  $\beta$ -lactam antibiotics, could also bind the donor strand of the cell wall analogously to a DD-peptidase. Among all  $\beta$ -lactamases tested, only OXA types and AmpR-Sfo1 yielded any apparent effect, possibly due to a cell wall donor binding activity, which could be the explanation for the reduction of cross-linking, due to the lack of terminal D-Ala that is needed for the cross-linking. However, a direct DD-endopeptidase activity on the mature PG or DD-carboxypeptidase activity on the cell wall donor strand cannot be excluded (41).

Production of the different  $\beta$ -lactamases had no apparent effect on the growth rate of *E. coli* under the noncompetitive experimental conditions (rich medium, LB broth, and no antibiotics), with similar growth rates being observed. Competition *in vitro* and in a mouse model showed that fitness decreased with the OXA-type (OXA-10-like and OXA-24) and AmpR-SFO-1  $\beta$ -lactamases. The effect on fitness and on PG composition was observed only when the SFO-1  $\beta$ -lactamase was cloned under the control of the *ampR* gene, since greater hydrolytic activity was detected in strains carrying AmpR-SFO-1 than in clones harboring only SFO-1. Although the regulation of the AmpR-mediated

expression of AmpC in *E. coli* seems to be simpler than that described in *Pseudomonas* (21), it is not possible to exclude completely a putative effect due the presence of AmpR in strain MG(pB-AmpR-Sfo1), but neither there is any evidence for that. Therefore, the effect of AmpR must be due essentially to the increase in expression, acting as an upregulator of SFO-1  $\beta$ -lactamase (28).

These data showed that expression of some OXA-type and AmpR-SFO-1  $\beta$ -lactamases in an *E. coli* strain entails a fitness cost, and they also provide some knowledge about potential weakness of selection of these resistant bacteria when expressing these genetic determinants of antibiotic resistance. The biological cost is thought to be the main driving force for reduction in the frequency of resistant bacteria in the absence of antibiotics (22).

To our knowledge, no clear explanation has been given as to why some  $\beta$ -lactamases are often isolated from a specific genus, whereas others are scarcely detected in a specific microorganism. Identification of differences in the impacts of different  $\beta$ -lactamases expressed in members of the *Enterobacteriaceae* may help in understanding why some  $\beta$ -lactamases are more widespread in some Gram-negative bacilli than in others.

While most extended-spectrum  $\beta$ -lactamases (ESBLs) have been found in *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, and other *Enterobacteriaceae*, most of the OXA-type ESBLs and carbapenemases have been mainly found in *P. aeruginosa* and *Acinetobacter* spp. Carbapenem-hydrolyzing OXA-type lactamases are often found in *Acinetobacter baumannii* (46), OXA-type lactamases with an extended spectrum in *P. aeruginosa*, and the OXA-48 carbapenem-hydrolyzing enzyme in members of the *Enterobacteriaceae* (37). Until now, the only OXA-10-like lactamase described in *Enterobacteriaceae* was OXA-101 (38). The SFO-1  $\beta$ -lactamase has been isolated only from *Enterobacter cloacae* (16, 28), and because of its plasmid location, it could be transmitted to other bacteria. To our knowledge, no OXA-24 has so far been described in *Enterobacteriaceae*.

The SFO-1 is the only class A  $\beta$ -lactamase with the *ampR* gene upstream (28). Few reports have described codified class C plasmids (4, 17, 36, 40) with the upstream *ampR* gene acting to induce expression. With all these data, it could be interesting to propose a hypothesis in which the low dissemination of these enzymes in

*Enterobacteriaceae* may be related to their effects on changes in PG and therefore to the decrease in fitness.

Although resistance traits encoded by plasmids are usually associated with a fitness cost (5), we observed that some  $\beta$ -lactamases did not affect fitness, which means that this relationship depends on the type of  $\beta$ -lactamase expressed, at least as assayed in our isogenic model. Hypothetically and based on the decrease in biological fitness caused by OXA-10-like, OXA-24, and AmpR-SFO-1  $\beta$ -lactamases in the absence of antibiotics, the strains expressing these enzymes probably would not be able to dominate the bacterial population. According to the above-described hypothesis, in the absence of antibiotics these strains will be displaced and the frequency of isolation will be lower. Interestingly, the *in vitro* data were confirmed in an *in vivo* model of mouse systemic infection.

No relationship between biofilm production and PG modifications was observed, since the expression of AmpR-SFO-1, OXA-24, and OXA-10-like genes decreased biofilm production in the same way as the TEM-1  $\beta$ -lactamase, with which no changes in the PG were observed. The decreased in biofilm formation has previously been attributed to the presence of class A and class D  $\beta$ -lactamases, specifically TEM-1 and OXA-3 (18). It has been hypothesized that the biofilm phenotypes of class A and class D  $\beta$ -lactamase-expressing transformants may be brought about by the ability of these  $\beta$ -lactamases to bind to or to modify PG (18), although this was not demonstrated in our model.

In conclusion, the expression of some specific  $\beta$ -lactamases may be associated with changes in the cell wall of the bacterial host, which are translated into a loss of fitness *in vivo* and *in vitro*. This may explain the "natural" selection of  $\beta$ -lactamases in a specific bacterial genus and may provide important data regarding the epidemiology of  $\beta$ -lactamases and the low rate of isolation in specific genus. Furthermore, the interaction with the PG observed with some of the  $\beta$ -lactamases studied, such as the AmpR-SFO-1, OXA-10-like, and OXA-24  $\beta$ -lactamases, supports the hypothesis that the PBPs and  $\beta$ -lactamases have evolved from a common gene ancestor (27).

#### ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by REIPI, Spanish Network for Research in Infectious Diseases (Instituto de Salud Carlos III, RD06/0008/0025), Fondo de Investigaciones Sanitarias (PI061368, PI081368, and PS09/00687), and SERGAS (PS07/90) and grants from Xunta de Galicia (07CSA050916PR) to G.B. A.F. is in receipt of a Río Hortega research support contract from Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Ciencia e Innovación. This work was partly supported by a grant from the Spanish Society for Microbiology and Infectious Disease (SEIMC) and by grant BFU2009-09200 awarded by the Ministry of Science and Innovation (MICINN) to J.A.A.

We are grateful to staff at the Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (CBMSO) and especially to Miguel Angel de Pedro for sharing his great scientific knowledge. We thank María del Carmen Fernández López for excellent technical support with animal experiments and Catalina Sueiro López from the University of A Coruña for assistance with TEM. We thank Sonia Pertega from the Clinical Epidemiology and Biostatistics Unit of A Coruña Hospital for help with the statistical analysis.

#### REFERENCES

1. Ambler RP. 1980. The structure of beta-lactamases. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 289:321–331.
2. Andersson DI, Levin BR. 1999. The biological cost of antibiotic resistance. *Curr. Opin. Microbiol.* 2:489–493.
3. Aranda J, et al. 2010. The cation-uptake regulators AdcR and Fur are necessary for full virulence of *Streptococcus suis*. *Vet. Microbiol.* 144:246–249.
4. Barnaud G, et al. 1998. *Salmonella enteritidis*: AmpC plasmid-mediated inducible beta-lactamase (DHA-1) with an ampR gene from *Morganella morganii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42:2352–2358.
5. Bjorkman J, Andersson DI. 2000. The cost of antibiotic resistance from a bacterial perspective. *Drug Resist. Updat.* 3:237–245.
6. Bonnet R, et al. 2000. A novel CTX-M beta-lactamase (CTX-M-8) in cefotaxime-resistant *Enterobacteriaceae* isolated in Brazil. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44:1936–1942.
7. Bou G, et al. 2002. Identification and broad dissemination of the CTX-M-14 beta-lactamase in different *Escherichia coli* strains in the northwest area of Spain. *J. Clin. Microbiol.* 40:4030–4036.
8. Bou G, Martínez-Beltrán J, Cervero G, Pérez-Díaz JC. 1999. Biochemical and genetic characteristics of TEM-29B, a novel extended spectrum beta-lactamase. *FEMS Microbiol. Lett.* 174:185–190.
9. Bou G, Oliver A, Martínez-Beltrán J. 2000. OXA-24, a novel class D beta-lactamase with carbapenemase activity in an *Acinetobacter baumannii* clinical strain. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44:1556–1561.
10. Bou G, Oliver A, Ojeda M, Monzon C, Martínez-Beltrán J. 2000. Molecular characterization of FOX-4, a new AmpC-type plasmid-mediated beta-lactamase from an *Escherichia coli* strain isolated in Spain. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44:2549–2553.
11. Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248–254.
12. Bradford PA. 2001. Extended-spectrum beta-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clin. Microbiol. Rev.* 14:933–951.
13. Bush K, Jacoby GA. 2010. Updated functional classification of beta-lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54:969–976.
14. Cariss SJ, et al. 2010. YieJ (CbrC) mediates CreBC-dependent colicin E2 tolerance in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 192:3329–3336.
15. Fernandez A, et al. 2007. Interspecies spread of CTX-M-32 extended-spectrum beta-lactamase and the role of the insertion sequence IS1 in down-regulating bla<sub>CTX-M</sub> gene expression. *J. Antimicrob. Chemother.* 59:841–847.
16. Fernandez A, et al. 2011. Emergence in Spain of a multidrug-resistant *Enterobacter cloacae* clinical isolate producing SFO-1 extended-spectrum beta-lactamase. *J. Clin. Microbiol.* 49:822–828.
17. Fortineau N, Poirel L, Nordmann P. 2001. Plasmid-mediated and inducible cephalosporinase DHA-2 from *Klebsiella pneumoniae*. *J. Antimicrob. Chemother.* 47:207–210.
18. Gallant CV, et al. 2005. Common beta-lactamases inhibit bacterial biofilm formation. *Mol. Microbiol.* 58:1012–1024.
19. Glauner B. 1988. Separation and quantification of mucopeptides with high-performance liquid chromatography. *Anal. Biochem.* 172:451–464.
20. Jacoby GA. 2009. AmpC beta-lactamases. *Clin. Microbiol. Rev.* 22:161–182.
21. Kong KF, et al. 2005. *Pseudomonas aeruginosa* AmpR is a global transcriptional factor that regulates expression of AmpC and PoxB beta-lactamases, proteases, quorum sensing, and other virulence factors. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49:4567–4575.
22. Levin BR. 2001. Minimizing potential resistance: a population dynamics view. *Clin. Infect. Dis.* 33(Suppl. 3):S161–S169.
23. Livermore DM. 1987. Radiolabelling of penicillin-binding proteins (PBPs) in intact *Pseudomonas aeruginosa* cells: consequences of beta-lactamase activity by PBP-5. *J. Antimicrob. Chemother.* 19:733–742.
24. Livermore DM, et al. 2007. CTX-M: changing the face of ESBLs in Europe. *J. Antimicrob. Chemother.* 59:165–174.
25. Luo N, et al. 2005. Enhanced *in vivo* fitness of fluoroquinolone-resistant *Campylobacter jejuni* in the absence of antibiotic selection pressure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102:541–546.
26. Mallo S, et al. 2010. A tripeptide deletion in the R2 loop of the class C beta-lactamase enzyme FOX-4 impairs cefoxitin hydrolysis and slightly increases susceptibility to beta-lactamase inhibitors. *J. Antimicrob. Chemother.* 65:1187–1194.
27. Massova I, Mobashery S. 1998. Kinship and diversification of bacterial penicillin-binding proteins and beta-lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42:1–17.
28. Matsumoto Y, Inoue M. 1999. Characterization of SFO-1, a plasmid-

Fernández et al.

- mediated inducible class A beta-lactamase from *Enterobacter cloacae*. Antimicrob. Agents Chemother. 43:307–313.
29. Merino M, et al. 2010. OXA-24 carbapenemase gene flanked by XerC/XerD-like recombination sites in different plasmids from different *Acinetobacter* species isolated during a nosocomial outbreak. Antimicrob. Agents Chemother. 54:2724–2727.
  30. Merino M, et al. 2010. Role of changes in the L3 loop of the active site in the evolution of enzymatic activity of VIM-type metallo-beta-lactamases. J. Antimicrob. Chemother. 65:1950–1954.
  31. Morosini MI, Ayala JA, Baquero F, Martinez JL, Blazquez J. 2000. Biological cost of AmpC production for *Salmonella enterica* serotype Typhimurium. Antimicrob. Agents Chemother. 44:3137–3143.
  32. Moya B, et al. 2009. Beta-lactam resistance response triggered by inactivation of a nonessential penicillin-binding protein. PLoS Pathog. 5:e1000353.
  33. Moya B, Juan C, Alberti S, Perez JL, Oliver A. 2008. Benefit of having multiple ampD genes for acquiring beta-lactam resistance without losing fitness and virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob. Agents Chemother. 52:3694–3700.
  34. Mroczkowska JE, Barlow M. 2008. Fitness trade-offs in blaTEM evolution. Antimicrob. Agents Chemother. 52:2340–2345.
  35. Naas T, Oxacelay C, Nordmann P. 2007. Identification of CTX-M-type extended-spectrum-beta-lactamase genes using real-time PCR and pyrosequencing. Antimicrob. Agents Chemother. 51:223–230.
  36. Nakano R, et al. 2004. CFE-1, a novel plasmid-encoded AmpC beta-lactamase with an ampR gene originating from *Citrobacter freundii*. Antimicrob. Agents Chemother. 48:1151–1158.
  37. Poirel L, Naas T, Nordmann P. 2010. Diversity, epidemiology, and genetics of class D beta-lactamases. Antimicrob. Agents Chemother. 54:24–38.
  38. Porto A, Ayala J, Gutkind G, Di Conza J. 2010. A novel OXA-10-like beta-lactamase is present in different *Enterobacteriaceae*. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 66:228–229.
  39. Pratt LA, Kolter R. 1998. Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili. Mol. Microbiol. 30:285–293.
  40. Reisbig MD, Hanson ND. 2002. The ACT-1 plasmid-encoded AmpC beta-lactamase is inducible: detection in a complex beta-lactamase background. J. Antimicrob. Chemother. 49:557–560.
  41. Sauvage E, Kerff F, Terrak M, Ayala JA, Charlier P. 2008. The penicillin-binding proteins: structure and role in peptidoglycan biosynthesis. FEMS Microbiol. Rev. 32:234–258.
  42. Suwalak S, Voravuthikunchai SP. 2009. Morphological and ultrastructural changes in the cell structure of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 following treatment with *Quercus infectoria* nut galls. J. Electron Microsc. (Tokyo) 58:315–320.
  43. Tayler AE, et al. 2010. Induction of beta-lactamase production in *Aeromonas hydrophila* is responsive to beta-lactam-mediated changes in peptidoglycan composition. Microbiology 156:2327–2335.
  44. Vollmer W, Blanot D, de Pedro MA. 2008. Peptidoglycan structure and architecture. FEMS Microbiol. Rev. 32:149–167.
  45. Walsh TR, Toleman MA, Poirel L, Nordmann P. 2005. Metallo-beta-lactamases: the quiet before the storm? Clin. Microbiol. Rev. 18:306–325.
  46. Walther-Rasmussen J, Hoiby N. 2006. OXA-type carbapenemases. J. Antimicrob. Chemother. 57:373–383.



#### ***7.4. Curriculum vitae***



## 7.4. CURRICULUM VITAE

### **DATOS PERSONALES:**

---

*Apellidos:* Fernández González.

*Nombre:* Ana

*DNI:* Omitido para versión online

*Lugar de nacimiento:* Omitido para versión online

*Fecha de nacimiento:* Omitido para versión online

*Dirección:* Omitido para versión online

*e-mail:* ana.fernandez.gonzalez@sergas.es//anifdez@hotmail.com

*Tlf. de contacto:* Omitido para versión online

### **FORMACIÓN ACADÉMICA:**

---

*Estudios Universitarios:* 1998-2003: **Licenciatura Farmacia** en la Universidad de Santiago de Compostela.

*Especialización en Microbiología clínica:* 2004-2008: **Especialista en Microbiología y Parasitología clínica** en el Complejo Hospitalario Universitario A Coruña

### **EXPERIENCIA LABORAL:**

---

**Marzo 2012- ...:** Contrato de investigación, Fundación CHU A Coruña. Dentro de este contrato cabe destacar la realización de una rotación en el hospital Gregorio Marañón en la Unidad de Biología Molecular del Servicio de Microbiología bajo la tutela de la Dra. Mercedes Marín, reconocida microbióloga clínica a nivel nacional.

Contratos de guardias en el Servicio de Microbiología del CHU A Coruña.

**Enero 2009-Enero 2012:** Contrato post-residencia “Río Hortega” llevado a cabo en el Complejo Hospitalario Universitario A Coruña bajo la tutela del Dr. Germán Bou. Cabe destacar la rotación externa durante 7 meses en el Instituto de Microbiología médica, inmunología e higiene de la Universidad de Colonia que versó sobre técnicas de epidemiología molecular, y se realizó bajo la tutela del Dr. Harald Seifert, reconocido microbiólogo clínico a nivel internacional.

**Junio-Septiembre 2008:** Adjunto Especialista de Área en el Servicio de Microbiología del Complejo hospitalario universitario A Coruña siendo responsable del área de Serología y de Enfermedades de transmisión sexual.

**2004-2008:** Especialista en Microbiología y Parasitología clínica. Residencia realizada en el Complejo Hospitalario Universitario A Coruña.

**Marzo-Septiembre 2003:** Prácticas en el Servicio de Farmacia hospitalaria en el hospital Provincial de Santiago de Compostela con la calificación de Matrícula de Honor.

**2002-2003:** Beca de colaboración en el departamento de Tecnología farmacéutica y galénica (Facultad de Farmacia de la Universidad de Santiago de Compostela). Proyecto:

“Formulación galénica de enzimas líticos de origen microbiano para el tratamiento de candidiasis.”

**Verano 2002** - Prácticas en el departamento de análisis químicos de la Cooperativa enológica “Jesús Nazareno” de O Barco de Valdeorras. (Prácticas laborales reconocidas por la Universidad de Santiago de Compostela)

#### **COMUNICACIONES CONGRESOS:**

---

##### **INTERNACIONALES:**

**Ana Fernández**, Paul G Higgins, Esther Zander, Meredith Hackel, Harald Seifert “Acquisition of carbapenem resistance favors expansion of a limited number of successful *Acinetobacter baumannii* clonal lineages” **22<sup>nd</sup> European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID)**. London, 31 de Marzo al 3 de Abril de 2012.

C. Gómez-González, N. Larrosa, E. Ruiz de Gopegui, **A. Fernández**, P. Rojo, F. Chaves. “Incidence and genetic diversity of Panton-Valentine leukocidin (PVL) methicillin-resistant (MRSA) and –susceptible *Staphylococcus aureus* (MSSA) causing infections in children in Spain” **50<sup>th</sup> ICAAC**; Boston, 12-15 de Septiembre, 2010.

**A. Fernández**, M. Poza, A. Perez, JA Saez-Nieto, R. Villanueva, G. Bou. “Nosocomial outbreak caused by an epidemic multiresistant (MDR) *Enterobacter cloacae* (Ec) strain producing an SFO-1 ESBL” **49<sup>th</sup> ICAAC**; San Francisco, 12-15 de Septiembre, 2009.

JM. Suarez, **A. Fernández**, MJ. Pereira, JA. Saez Nieto, R. Villanueva, G. Bou. “Risk factors associated with acquisition of an epidemic (Ec) ESBL-producing strain of *Enterobacter cloacae* in a tertiary teaching hospital” **48<sup>th</sup> ICAAC**; Washington 25-28 de Octubre, 2008.

S. Mallo, FJ. Perez-Llarena, A. Beceiro, **A. Fernández**, R. Villanueva and G. Bou. “Study of Amino Acid Positions in FOX-4 Class C beta-lactamase homologous to Q120 and Y221 of P99 from *Enterobacter cloacae*” **47<sup>th</sup> ICAAC**, Abstracts; Chicago, 18-20 de Septiembre, 2007.

**A. Fernández**, D. Velasco, R. Villanueva, G. Bou. “Study of susceptibility to Posaconazole (POS) and Caspofungin (CAS) in Invasive Yeast Strains (IYS) isolated from Blood Cultures and CSF during two years in a Spanish University Hospital. Evaluation of the POS and CAS Etest” **46<sup>th</sup> Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC)**; San Francisco, 27-30 de Septiembre. 2006.

##### **NACIONALES:**

**Ana Fernández**, María Merino, Paul G. Higgins, Esther Zander, Meredith Hackel Germán Bou y Harald Seifert. “Utilización de métodos moleculares como herramientas para la correcta identificación de *Acinetobacter baumannii*” **XVI Congreso de la SEIMC 2012** que se celebrará entre el 9 y el 11 de mayo de 2012 en Bilbao. Publicado en la revista *Enferm Infecc Microbiol Clin*. Mayo 2012; 30:343

M. Merino Carballeira, M. Poza, A. Beceiro, S. Rumbo-Feal, **A. Fernández**, R. Villanueva, M. Rodríguez, M. Tomás y G. Bou. "Primer brote en España producido por una cepa de *Acinetobacter baumannii* multirresistente productora de la  $\beta$ -lactamasa OXA-23. **XVI Congreso de la SEIMC 2012** que se celebrará entre el 9 y el 11 de mayo de 2012 en Bilbao. Publicado en la revista *Enferm Infecc Microbiol Clin*. Mayo 2012; 30:333

F.J. Pérez Llarena, L. Zamorano, A. Beceiro, **A. Fernández**, B. Aracil, E. Cercenado, E. Miró, A. Oliver, J. Oteo, F. Navarro y G. Bou. "Caracterización de la betalactamasa IMP-28 obtenida de un aislado de *Klebsiella oxytoca*" **XVI Congreso de la SEIMC 2012** que se celebrará entre el 9 y el 11 de mayo de 2012 en Bilbao. Publicado en la revista *Enferm Infecc Microbiol Clin*. Mayo 2012; 30:333

A. Pérez Gómez, M. Poza Domínguez, C. Latasa Osta, **A. Fernández González**, D. Ramos Barbón, I. Lasa Uzcudun, R. Villanueva González y G. Bou Arévalo. "Regulación de la bomba de expulsión de antimicrobianos ACRA-B-TOLC de *Enterobacter cloacae* a través de las proteínas ROBA y SOXS." **XIV Congreso de la SEIMC**. Barcelona 19-22 de mayo de 2010. Publicado en *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2010; 28: 328

C. Gómez González, N. Larrosa, E. Ruiz de Gopegui, **A. Fernández**, A. Palacios, F. Moraga, J. Dueñas, F. Suárez, M. Barrios, F. Chaves. "Infecciones por *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina asociado a la comunidad en Población Pediátrica: Estudio multicéntrico." **XIV Congreso de la SEIMC**. Barcelona 19-22 de mayo de 2010. Publicado en *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2010; 28: 223-224

E. Miró, J. Agüero, R. Bartolomé, **A. Fernández**, M.C. Conejo, G. Bou, J.J. González, N. Lara, L. Martínez-Martínez, B. Mirelis, A. Oliver, J. Oteo, A. Pascual, J. Rodríguez-Baño, L. Zamorano y F. Navarro. "Estudio de la prevalencia de betalactamasas AmpC plasmídicas y carbapenemasas en enterobacterias en España." **XIV Congreso de la SEIMC**. Barcelona 19-22 de mayo de 2010. Publicado en *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2010; 28: 321-322

J. Rodríguez-Baño, E. Miró, A. Coelho, M. Gozalo, N. Borrell, G. Bou, M.C. Conejo, V. Pomar, N. Larrosa, J. Agüero, A. Oliver, **A. Fernández**, N. Lara, A. Pascual y F. Navarro. "Características epidemiológicas y clínicas de las infecciones y colonizaciones por enterobacterias productoras de betalactamasas tipo ampC plasmídicas." **XIV Congreso de la Sociedad Española de Enfermedades infecciosas y microbiología clínica (SEIMC)**. Barcelona 19-22 de mayo de 2010. Publicado en *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2010; 28: 234-235

**A. Fernández**, M. Poza, A. Pérez, JA Sáez-Nieto, R. Villanueva y G. Bou. "Estudio de un brote nosocomial causado por *Enterobacter cloacae* multirresistente productor de la betalactamasa SFO-1." **XIII Reunión de la SEIMC**. Sevilla 3-5 de mayo de 2009. Publicado en *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2009; 27:66

**A. Fernández**, A. Cañizares, MJ. G<sup>a</sup>-Triñanes, M. Lobato, R. Villanueva. "Sustitución de la antigenemia pp65 de CMV por PCR a tiempo real en pacientes trasplantados." **XIII Congreso de la SEIMC**. Madrid 11-14 de Mayo de 2008. Publicado en *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2008; 26

D. Velasco, **A. Fernández**, C. Fontecoba, C. Zúñiga, F. Lueiro, F. Molina, R. Villanueva. "Impacto clínico de la resistencia de los anaerobios causantes de bacteriemia." **XIII Congreso de la SEIMC**. Madrid 11-14 de Mayo de 2008. Publicado en *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2008; 26

A. Pérez, MJ. Barba, **A. Fernández**, M. Poza, A. Beceiro, C. Gayoso, MD. Sousa, R. Villanueva, y G. Bou. "Mecanismos asociados a la reducción en la sensibilidad a tigeciclina

(TGC) en una cepa clínica de *Escherichia coli* portadora de una beta-lactamasa de espectro extendido (BLEE).” **XIII Congreso de la SEIMC**. Madrid 11-14 de Mayo de 2008. Publicado en *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2008; 26

M. Tomás, S. Pita, A. Perez, **A. Fernández**, S. Pertega, S. Mallo, F. Lueiro, R. Villanueva, G. Bou. Comunicación y póster: “Factores de riesgo asociados a mortalidad por bacteriemias por *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM).” **XII Reunión de la SEIMC**. A Coruña 9-11 de Mayo de 2007. Publicado en *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2008; 25

**A. Fernández**, M. Cartelle, E. Gil, E. Torres, R. Villanueva, y G. Bou. Comunicación y póster: “Posible transmisión *in vivo* del gen CTX-M-32 entre dos especies distintas de *Enterobacteriaceae*.” **XII Congreso de la SEIMC**. Valencia 10-13 de Mayo de 2006. Publicado en *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2008; 24

---

#### PREMIOS:

**SELECCIÓN como artículo mensual destacado por la Sociedad Americana de Microbiología (ASM) para su publicación en el “Journal Highlights” sección “Microbe” del artículo titulado “Expression of OXA-type and SFO-1  $\beta$ -lactamases induces changes in peptidoglycan composition and affects bacterial fitness.”**

El enlace de la publicación es el siguiente:

[http://www.microbemagazine.org/index.php?option=com\\_content&view=article&id=5016:new-findings-may-bear-on-epidemiology-of-lactamases&catid=964:04-2012-journal-highlights&Itemid=1242](http://www.microbemagazine.org/index.php?option=com_content&view=article&id=5016:new-findings-may-bear-on-epidemiology-of-lactamases&catid=964:04-2012-journal-highlights&Itemid=1242)

**PREMIO A LA MEJOR COMUNICACIÓN** en el Congreso anual de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). “Infecciones por *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina asociado a la comunidad en población pediátrica: Estudio multicéntrico” Barcelona 19-22 de mayo de 2010.

**PREMIO A LA MEJOR COMUNICACIÓN** en el Congreso anual de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). “Estudio de un brote nosocomial causado por *Enterobacter cloacae* (EC) multirresistente productor de la betalactamasa SFO-1” Sevilla, 3-5 junio 2009.

**PREMIO AL RESIDENTE CON MEJORES PUBLICACIONES** en el año 2007. X Jornadas para la promoción de la investigación biomédica. A Coruña, 19 de Junio de 2008.

---

#### PUBLICACIONES:

Miró E, Agüero J, Larrosa MN, **Fernández A**, Conejo MC, Bou G, González-López JJ, Lara N, Martínez-Martínez L, Oliver A, Aracil B, Oteo J, Pascual A, Rodríguez-Baño J, Zamorano L, Navarro F. Prevalence and molecular epidemiology of acquired AmpC  $\beta$ -lactamases and carbapenemases in *Enterobacteriaceae* isolates from 35 hospitals in Spain. 2012. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. Epub Sep 7.

Margarita Poza, Carmen Gayoso, Manuel J Gómez, Soraya Rumbo-Feal, María Tomás, Jesús Aranda, **Ana Fernández**, Germán Bou. Exploring bacterial diversity in hospital environments by GS-FLX titanium pyrosequencing. 2012. *PLoS ONE* 7(8): e44105

Francisco José Pérez-Llarena, **Ana Fernández**, Laura Zamorano, Frédéric Kerff, Alejandro Beceiro, Belén Aracil, Emilia Cercenado, Elisenda Miró, Antonio Oliver, Jesús Oteo, Ferrán Navarro and Germán Bou. 2012. Characterization of a novel IMP-28 metallo-beta-lactamase from a spanish *Klebsiella oxytoca* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother.* 56(8):4540. Epub 2012 June 5

**Fernández A**, Pérez A, Ayala JA, Mallo S, Rumbo-Feal S, Tomás M, Poza M, Bou G. 2012. Expression of OXA-type and SFO-1  $\beta$ -lactamases induces changes in peptidoglycan composition and affects bacterial fitness. *Antimicrob Agents Chemother.* Apr;56(4):1877-84. Epub 2012 Jan 30

Pérez A, Poza M, **Fernández A**, Fernández MD, Mallo S, Merino M, Rumbo-Feal S, Cabral MP, Bou G. 2012. Involvement of the AcrAB-TolC efflux pump in the resistance, fitness and virulence of *Enterobacter cloacae*. *Antimicrob Agents Chemother.* Apr;56(4):2084-90. Epub 2012 Jan 30.

Rodríguez-Baño J, Miró E, Villar M, Coelho A, Gozalo M, Borrell N, Bou G, Conejo MC, Pomar V, Aracil B, Larrosa N, Agüero J, Oliver A, **Fernández A**, Oteo J, Pascual A, Navarro F. 2011. Colonisation and infection due to Enterobacteriaceae producing plasmid-mediated AmpC  $\beta$ -lactamases. *J Infect.* Feb;64(2):176-83

Mora A, Blanco M, López C, Mamani R, Blanco JE, Alonso MP, García-Garrote F, Dahbi G, Herrera A, **Fernández A**, Fernández B, Agulla A, Bou G, Blanco J. 2011. Emergence of clonal groups O1:HNM-D-ST59, O15:H1-D-ST393, O20:H34/HNM-D-ST354, O25b:H4-B2-ST131 and ONT:H21, 42-B1-ST101 among CTX-M-14-producing *Escherichia coli* clinical isolates in Galicia, northwest Spain. 2011. *Int J Antimicrob Agents.* Jan;37(1):16-21

**Fernández A**, Pereira MJ, Suárez JM, Poza M, Treviño M, Villalón P, Sáez-Nieto JA, Regueiro BJ, Villanueva R, Bou G. 2011. Emergence in Spain of a Multidrug Resistant *Enterobacter cloacae* clinical isolate producing SFO-1 extended-spectrum  $\beta$ -lactamase. *J Clin Microbiol.* Mar; 49(3):822-8.

**Ana Fernández**, María Fernanda Peña, Juan Manuel Barja y Rosa Villanueva. Lesiones cutáneas en un paciente agricultor con presencia de fiebre. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2010;28:469-70.

**Ana Fernández**, David Velasco, Francisco Lueiro and G. Bou. 2008. Estudio de sensibilidad antifúngica para posaconazol y caspofungina en levaduras responsables de infección fúngica invasiva (2002-2003). Evaluación del sistema E-test. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 26: 82-85.

**Ana Fernández**, Emilia Gil, Mónica Cartelle, Astrid Pérez, Alejandro Beceiro, Susana Mallo, María Mar Tomás, Francisco J.Pérez-Llanera, Rosa Villanueva and German Bou. 2007. Interspecies spread of CTX-M-32 extended-spectrum  $\beta$ -lactamase and the role of the insertion sequence IS1 in down-regulating blaCTX-M gene expression. *J Antimicrob Chemother.* May; 59(5):841-847.

Beceiro A, Perez-Llanera FJ, Perez A, Tomas M del M, **Fernandez A**, Mallo S, Villanueva R, Bou G. 2007. Molecular characterization of the gene encoding a new AmpC {beta}-lactamase in *Acinetobacter baylyi*. *J Antimicrob Chemother.* May; 59(5): 996-1000.

A. Perez, D. Canle, C. Latasa, M. Poza, A. Beceiro, M. Tomas, **A. Fernández**, S. Mallo and G. Bou. 2007. Cloning, nucleotide sequencing, and analysis of the AcrAB-TolC efflux pump of *Enterobacter cloacae* and its involvement in antibiotic resistance in a clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother.* 51: 3247-53.

Del Mar Tomas M, Moure R, Saez Nieto JA, Fojon S, **Fernandez A**, Diaz M, Villanueva R, Bou G. 2005. *Williamsia muralis* pulmonary infection. Emerg Infect Dis. Aug;11 (8): 1324-25.

---

### **FORMACIÓN COMPLEMENTARIA:**

---

#### **Cursos:**

Febrero 2011-Febrero 2012 Curso **“Enfermedades Infecciosas 2011: Infección por el VIH en el adulto”** Actividad acreditada con 5,3 créditos (25 horas lectivas).

Mayo 2010-Febrero 2011. Curso **“Atención compartida en enfermedades infecciosas y uso de antimicrobianos”** Actividad acreditada en base a la encomienda de gestión concedida por los Ministerios de Sanidad y Política Social y Ministerio de Educación al Consejo General de Colegios Oficiales de Médicos con 6,8 créditos para farmacéuticos, equivalentes a 41 horas lectivas.

18-19 de Noviembre 2010. 18º Simposio científico de la fundación Lilly: **“Microbioma descubriendo el último órgano del cuerpo humano”**. 14 horas lectivas.

Mayo 2010-Enero 2011. Curso **“Lectura interpretada del antibiograma”** Actividad acreditada en base a la encomienda de gestión concedida por los Ministerios de Educación, Cultura y Deporte y de Sanidad y Consumo al Consejo General de Colegios Oficiales de Médicos con 4,20 CRÉDITOS equivalentes a 18 horas lectivas.

Septiembre 2010-Junio 2011. Curso **“Infecciones nosocomiales en la era de la multirresistencia”** Actividad acreditada para farmacéuticos por la Comisión de Formación Continuada con 10,2 créditos.

12 de Noviembre 2009, Madrid. IV Jornadas científicas de la Red española de investigación en patología infecciosa (REIPI): **“Investigación en problemas de salud”**

17-18 de septiembre de 2009. **“Reunión científica sobre proteómica clínica: De la huella peptídica a la imagen tisular”** 15 horas.

Febrero 2009, A Coruña. Curso: **“Cómo preservar los antibióticos de hoy para el mañana en infecciones respiratorias de las vías bajas (IRVB)”** 0,6 créditos ó 3 horas lectivas.

Enero 2009-Septiembre 2010. Curso **“Actualización en la terapéutica antimicrobiana”** Actividad acreditada en base a la encomienda de gestión concedida por los Ministerios de Educación, Cultura y Deporte y de Sanidad y Consumo al Consejo General de Colegios Oficiales de Médicos con 10,1 CRÉDITOS equivalentes a 50 horas lectivas.

Enero-Diciembre 2008. Curso **“Infecciones de los pacientes transplantados”**. Actividad acreditada en base a la encomienda de gestión concedida por los Ministerios de Educación, Cultura y Deporte y de Sanidad y Consumo al Consejo General de Colegios Oficiales de Médicos con 7.2 CRÉDITOS.



Curso para la obtención del **“Diploma de Innovación Tecnológica y Gestión en el Laboratorio Clínico.”** Dividido en varios bloques de contenidos y la realización de dos trabajos de investigación. 25 créditos avalados por la Universidad Europea de Madrid:

- 3-7 de Septiembre de 2007: Bloques A y B: Investigación Clínica y Biomédica.  
Organización de Laboratorios. Normalización, Guías y Algoritmos.
- 22-26 de Octubre de 2007: Bloques C, D y E: Calidad en el Laboratorio.  
Sistemas de Información en la Gestión de los laboratorios. Gestión clínica y costes.
- Septiembre-Diciembre: Realización de los trabajos de investigación necesarios para la obtención del diploma.

Febrero-Marzo 2007. Asistencia como oyente al **“Master de Medicina Tropical y Salud Internacional.”** Curso 2006-07. Hospital Clinic. Barcelona.

24 Febrero 2007: **“XVII Jornada Medicoquirúrgica de Pediatría. Atención al niño viajero, al inmigrante y al adoptado.”** Hospital de nens. Barcelona. (0,4 créditos por el sistema nacional de salud)

Febrero 2006. **“Regulación de la expresión génica.”** Curso de doctorado de la Universidad de La Coruña, Departamento de Biología celular y molecular. Programa de doctorado: Genética, bioquímica y biotecnología (Programa con Mención de Calidad para el curso 2005-2006)

Mayo 2006. **“Epidemiología molecular de los microorganismos implicados en procesos infecciosos: identificación y control de brotes epidémicos.”** Curso de doctorado de la Universidad de La Coruña, Departamento de Biología celular y molecular. Programa de doctorado: Genética, bioquímica y biotecnología (Programa con Mención de Calidad para el curso 2005-2006)

Mayo 2006. **“Bases moleculares de la resistencia a antibióticos en microorganismos causantes de patología infecciosa.”** Curso de doctorado de la Universidad de La Coruña, Departamento de Biología celular y molecular. Programa de doctorado: Genética, bioquímica y biotecnología (Programa con Mención de Calidad para el curso 2005-2006)

Febrero 2006. **“Biología, cultivo y aplicación de las microalgas marinas.”** Curso de doctorado de la Universidad de La Coruña. Programa de doctorado: Genética, bioquímica y biotecnología (Programa con Mención de Calidad para el curso 2005-2006)

Octubre-Diciembre 2003: **“Curso de Formación Especializada para farmacéuticos.”** Academia CEMS (Valencia).

Verano 2001: **“Medicina y Sociedad. Nuevos tratamientos: Bioética, Farmacia y Medicina”** impartido por la Universidad Internacional Menéndez Pelayo con la concesión de una beca completa.

Verano 2000: **“Escuela de Farmacología Teófilo Hernando. Medicamentos biotecnológicos”** impartido por la Universidad Internacional Menéndez Pelayo con la concesión de una beca completa.

**Idiomas:**

Inglés: Nivel medio (5º grado por el Centro de lenguas modernas de la U.S.C.)  
Francés: Nivel Elemental (1º grado por el Centro de lenguas modernas U.S.C.)  
Gallego: Nivel alto (Cursos de iniciación y de perfeccionamiento de lengua gallega.)

**Informática:** Word, Excel, Windows, EndNote, SPSS, Internet en el ámbito de usuario.

**Cursos impartidos:**

- **“Curso de introducción a la práctica clínica” 1 hora.** Docencia dirigida a residentes del Complejo Hospitalario Universitario A Coruña. 2 de Julio de 2007.
- **“Reacciones de aglutinación y precipitación. Diagnóstico microbiológico.”** Curso de actualización en técnicas de inmunología aplicadas al laboratorio. **5 horas.** Docencia dirigida a profesores de módulos profesionales del ámbito sanitario y financiada por la Xunta de Galicia. 10 de Septiembre de 2007.

---

**PARTICIPACIÓN EN PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN:**

---

**1. Estudios estructura-función en beta-lactamasas de clase C. 2004-2007.**

REFERENCIA: PI040514

Financiado por el Instituto de salud Carlos III (FIS)

Investigador principal: Germán Bou Arévalo.

Investigadores colaboradores: Bou G, Cañizares A., Molina F, Beceiro A, Velasco D, Villanueva R, Durán MT, Cartelle M, **Fernández A.**

**2. Identificación de genes de virulencia del patógeno humano *Acinetobacter baumannii* expresados preferentemente “in vivo”. 2007-2010**

Financiado por la Consellería de sanidade de la Xunta de Galicia.

Número de expediente: PS07/51

Investigador principal Esteban Fernandez Moreira.

Investigadores colaboradores: Francisco José Perez Llarena, M<sup>a</sup>del Mar Tomás Carmona, Susana Mallo Cancela, **Ana Fernández González.**

**3. Impacto clínico y epidemiología molecular de las infecciones por *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina de adquisición comunitaria en población pediátrica: Estudio multicéntrico.**

REFERENCIA: PI081520

Financiado por el Instituto de salud Carlos III (FIS)

Investigador principal: Fernando Chaves Sanchez.

Investigadores colaboradores: Fernando Chaves, Pablo Rojo, Maria Daskalaki, Alba Palacios Cuesta, Joaquín R. Otero, fNieves Larrosa Escartín, Fernando Moraga Lloc, Enrique Ruiz de Gopegui, Joaquín Dueñas, **Ana Fernandez** y Ana Belén Alas Barbeito.

**4. Estudio de la prevalencia y epidemiología de las resistencias a betalactámicos mediadas por betalactamasas plasmídicas tipo AmpC y por carbapenemasas, en enterobacterias, en España .**

Financiado por el Instituto de salud Carlos III (FIS)

REFERENCIA: PS09/00125

Investigador principal: Ferrán Navarro Risueño.

Investigadores colaboradores: MC Conejo, L Zamorano, J Agüero, **A Fernández**, R Bartolomé, B Aracil.

**5. Genómica y transcriptómica de biofilms de *A. baumannii*. 2012-2014.**

Financiado por el Ministerio de Ciencia e Innovación.

REFERENCIA: PI11/01034

Investigador principal: Margarita Poza

Investigadores colaboradores: **Ana Fernández**, María Merino, Soraya Rumbo, Clara Póvoa, Astrid Pérez y Carmen Gayoso.

